

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTIMULOS SENSOMOTORES RELEVANTES PARA EL APRENDIZAJE DE OLORES ASOCIADOS AL AMAMANTAMIENTO EN CONEJOS NEONATOS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A
DANIELA NURIA LABRA CARDERO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ROBYN E. HUDSON



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Estímulos Sensoriales Relevantes para el Aprendizaje de Olores Asociados al  
Amamantamiento en Conejos Neonatos (*Oryctolagus cuniculus*)

realizado por DANIELA NURIA LABRA CARDERO

Con número de cuenta 9450296-3

pasante de la carrera de **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario  
Propietario

Dr. Robyn Elizabeth Hudson

Dr. Margarita Martínez Gómez

Propietario

Biol. Julio Alejandro Prieto Sagrado

Suplente

Dr. Gabriel Roldán Roldán


Suplente


Dr. Constantino de Jesús Macías García

FACULTAD DE CIENCIAS

U. N. A. M.

Consejo Departamental de **BIOLOGÍA**

  
Dra. Patricia Ramos Morales

  
DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

**Para mis papás.  
Para los conejos.  
Gracias**

## AGRADECIMIENTOS

A Robyn por dirigirme la tesis y enseñarme acuciosamente a escribirla. Por enseñarme también a verme de mi misma y de los avatares de la ciencia a desparpajo.

A Adela, Luis y Marcos sin los cuales yo no hubiera completado este trabajo, por su ayuda en la planeación y ejecución de los experimentos.

A Carolina Rojas Castañeda por su excelente asistencia técnica y a todas las personas del laboratorio, a Margarita Martínez Gómez por su apoyo y entusiasmo, a Esther, a Tere.

A Manuel y Salvador del Bioterio que cuidaron de las conejas como padres comprometidos.

A Hans Distel por toda su asesoría cibernética y estadística, esperando conocerlo pronto!

A todos mis amigos de la carrera y aledaños, Omar, Bárbara, Argelia, León, Paco, Toño, Ek, Ale, Aurora, en particular a Cynthia y a Sotres. A Andrea y a todos los que me apoyaron durante el proceso.

A todos mis amigos.

A mi familia. A la abuela.

A Leandro porque lo amo.

A todos mis maestros.

A la Facultad de Ciencias.

¡A todos pues!

Agradezco profundamente a mis sinodales, Margarita, Gabriel, Julio y Tino por haber leído y comentado este trabajo.

**Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del proyecto de PAPIIT IN217100 y a al apoyo de PROBETEL.**

## ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de figuras.....	iii
Resumen.....	iv
1. Introducción.....	1
1.1 El olfato.....	2
1.1.1 En mamíferos neonatos.....	3
1.2 Aprendizaje olfativo .....	5
1.2.1 Aprendizaje olfativo en conejos neonatos.....	5
2. Antecedentes.....	7
2.1 Conducta maternal de la coneja.....	7
2.1.1 Embarazo y parto.....	7
2.1.2 Amamantamiento.....	8
2.2 Estrategias de los gazapos.....	8
2.2.1 Anticipación circádica del amamantamiento.....	9
2.2.2 Conducta de búsqueda de pezón .....	9
2.3 Aprendizaje olfativo en los gazapos.....	11
2.3.1 Estímulos relevantes para el aprendizaje de olores asociados al amamantamiento.....	12
2.4 Ventajas y faltantes del paradigma experimental.....	14
2.4.1 Ventajas.....	14
2.4.2 Faltantes.....	15
3. Hipótesis.....	16
3.1 Hipótesis general.....	16
3.2 Predicciones.....	16
4. Objetivos.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos particulares.....	17

5. Metodología.....	18
5.1 Animales.....	18
5.2 Diseño experimental.....	19
5.2.1 Condicionamiento.....	23
5.2.2 Prueba de evocación.....	27
5.2.3 Videograbación.....	29
5.3 Análisis de la conducta.....	29
5.3.1 Parámetros conductuales.....	29
5.3.2 Otras medidas.....	33
5.3.3 Análisis estadístico.....	33
6. Resultados.....	35
6.1 Condicionamiento.....	35
6.2 Prueba de evocación.....	37
6.2.1 Conducta individual de los gazapos sobre las pieles sin y con perfume.....	37
6.2.2 Conducta de los grupos sobre las pieles sin y con perfume.....	40
6.2.3 La conducta de búsqueda.....	42
6.2.4 Búsqueda dentro y fuera del área de estímulo.....	47
7. Discusión y Conclusiones.....	54
8. Bibliografía.....	59
Anexo.....	66
1. Medidas de la arena de la prueba de evocación.....	66
2. Tarjeta identificadora.....	66
3. Hoja de registro.....	67

## Índice de figuras

<b>Fig. 1</b> Condicionamiento clásico a olores durante el amamantamiento en gazapos neonatos.....	12
<b>Fig. 2</b> Coneja en su jaula maternal, parada al lado de una caja nido.....	18
<b>Fig. 3</b> Esquematación del diseño experimental.....	22
<b>Fig. 4</b> Coneja anestesiada sujeta bocarriba: ANE.....	24
<b>Fig. 5</b> Acercamiento al área ventral de una coneja: ADH.....	25
<b>Fig. 6</b> Acercamiento al vientre de una madre con "multikini": BUS.....	26
<b>Fig. 7</b> Arena de prueba.....	26
<b>Fig. 8</b> Vista superior del área de prueba con un gazapo condicionado sobre una piel perfumada.....	30
<b>Fig. 9</b> Ejemplo del patrón conductual ejercido por un gazapo condicionado.....	32
<b>Fig. 10</b> Repertorio conductual individual durante la prueba de evocación de los gazapos condicionados sobre una madre anestesiada y con leche (ANE).....	38
<b>Fig. 11</b> Repertorio conductual individual durante la prueba de evocación de los gazapos no condicionados (controles) pero expuestos a una madre anestesiada y con leche (cANE).....	39
<b>Fig. 12</b> Tiempo total de búsqueda de todos los grupos.....	41
<b>Fig. 13</b> Distribución de los eventos de búsqueda durante la prueba de evocación sobre la piel sin perfume; A) NAT y cNAT, B) ANE y cANE y C) SL y cSL.....	44
<b>Fig. 14</b> Distribución de los eventos de búsqueda durante la prueba de evocación sobre la piel con perfume; A) NAT y cNAT, B) ANE y cANE y C) SL y cSL.....	45
<b>Fig. 15</b> Distribución de los eventos de búsqueda para los grupos condicionados ADH y BUS durante la prueba de evocación.....	46
<b>Fig. 16</b> Eventos de búsqueda promedios iniciados dentro o fuera del área de estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación.....	49
<b>Fig. 17</b> Tiempo total de permanencia dentro o fuera del área del estímulo para todos los grupos.....	50
<b>Fig. 18</b> Porcentaje de búsqueda relativo al tiempo total de permanencia dentro del área del estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación.....	52
<b>Fig. 19</b> Porcentaje de búsqueda relativo al tiempo total de permanencia fuera del área del estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación.....	53



## Resumen

En los conejos europeos, la presencia de una feromona materna es esencial para desencadenar la conducta de búsqueda de pezón y el amamantamiento en los gazapos. A pesar de que la respuesta a la feromona es innata, si el vientre de la madre es perfumado, los gazapos aprenden el olor novedoso después de una sola exposición de alrededor de 3 min. Posteriormente, al ser colocados sobre una piel perfumada con el mismo olor los sujetos condicionados, a diferencia de los no condicionados, responden a él con la conducta estereotipada de búsqueda de pezón como si fuera la feromona materna.

Con el fin de examinar la participación reforzante de diferentes estímulos sensoriomotores presentes durante el aprendizaje (i.e. durante el amamantamiento), se generaron 8 grupos experimentales ( $n = 16$ ) de gazapos entre 0 y 3 días de nacidos. De los 8 grupos, 5 corresponden a animales condicionados al olor novedoso Chanel No. 5 y 3 corresponden a animales controles, no condicionados. Los grupos condicionados sobre madres perfumadas fueron: (i) amamantados de forma *natural* por la madre despierta en el nido (NAT), (ii) colocados sobre una madre *anestesiada* sujeta bocarriba e inyectada con oxitocina para que proveyera a los gazapos de leche (ANE), (iii) colocados sobre la madre anestesiada pero *sin leche* (SL), (iv) sujetos inmóviles sobre los pezones sin leche permitiéndoles *adherirse* a ellos (ADH) y (v) colocados sobre una madre anestesiada con los pezones cubiertos, permitiéndoles *buscar* libremente pero no adherirse (BUS). Los tres grupos controles (i) cNAT, (ii) cANE y (iii) cSL, fueron manipulados de la misma manera que los tres primeros grupos descritos, NAT, ANE y SL pero las madres no fueron perfumadas.

Todos los grupos realizaron una prueba de evocación 24 h después del condicionamiento en la cual eran colocados en una arena de acrílico 3 min sobre una piel sin perfumar y posteriormente 3 min sobre una piel perfumada. El parámetro principal evaluado fue la conducta de búsqueda de pezón. Se calculó para cada grupo sobre las diferentes pieles: el tiempo total de búsqueda, el número de sujetos buscando por grupo, el número de eventos de búsqueda, la distribución de búsquedas en el tiempo y la distribución de las búsquedas relativa al área de aplicación del estímulo olfativo. También se evaluó la actividad general de los gazapos según el repertorio conductual que presentaban durante la prueba sobre cada piel, dividido en búsqueda, rasquiña, desplazamiento o inmovilidad. Por último se evaluó el tiempo total que los gazapos estuvieron en contacto con el vientre materno, y para los grupos pertinentes, el tiempo total de adhesión a los pezones y/o la correlación entre peso y búsqueda y entre ingesta de leche y búsqueda.

Todos los grupos condicionados aprendieron el olor novedoso. Sobre la piel sin perfume no se encontraron diferencias significativas entre animales controles y condicionados más que para rasquiña y desplazamiento, ni para búsqueda ni para inmovilidad.

Sobre la piel con perfume el tiempo total de búsqueda fue significativamente diferente entre los grupos condicionados (Kruskal-Wallis  $p = 0.009$ ), con NAT: 14.5 s, ANE: 22.5 s, SL: 9.5 s, ADH 11.5 s, BUS: 2.5 s. El análisis post hoc mostró que los grupos condicionados fueron buscaron significativamente mas que sus controles no condicionados (0 s para los tres grupos, cNAT, cANE y cSL). Los grupos condicionados también difirieron entre sí sobre esta piel en el número de sujetos buscando para cada grupo (NAT: 13, ANE: 15, SL: 12, ADH: 14, BUS: 11) , en el número de búsquedas, en el porcentaje de búsquedas iniciadas dentro del área del estímulo (87%, 76%, 66%, 66% y 46% respectivamente) y en el porcentaje de búsqueda relativo al área considerada como de estímulo (Kruskal-Wallis  $p = 0.0004$ ) siendo la mediana de cada grupo NAT: 51%, ANE: 68%, SL: 19%, ADH: 53% y BUS: 0%.) Todos los grupos buscaron significativamente más que BUS dentro del área excepto SL.

Los grupos no condicionados presentaron cNAT : 3, cANE: 3, cSL: 3 sujetos buscando sobre la piel con perfume y con cNAT: 0%, cANE: 0%, cSL: 0% de búsquedas iniciadas dentro del área.

El análisis de la actividad general de los gazapos no permitió distinguir claramente entre los grupos por lo que no se analizó con mayor detalle. La ingesta de leche y el peso al nacer no tuvieron ninguna correlación con el tiempo de búsqueda de los diferentes grupos. El tiempo de adhesión para los grupos ANE, ADH y SL fueron significativamente diferentes entre sí (ANOVA  $p = 0.006$ ), con ANE y ADH presentando mayor tiempo de adhesión que SL pero no entre ellos.

Los resultados del presente trabajo sugieren que ni la estimulación provista durante el amamantamiento natural, i.e. madre despierta, ambiente del nido, presencia de hermanos, ni la leche, ni el ejercicio de la conducta de búsqueda y la presencia de la feromona en concentraciones naturales tienen un papel principal como reforzadores para este aprendizaje olfativo, mientras que la estimulación introral recibida por los gazapos al adherirse a los pezones parece fungir como el reforzador de mayor relevancia.

## 1. Introducción

El presente trabajo trata sobre el olfato y la conducta en conejos neonatos, en particular sobre el aprendizaje olfativo. Trata sobre la relación entre la percepción de estímulos y la asociación de éstos a la ejecución de una conducta estereotipada.

¿Cómo se adaptan los organismos a su medio? ¿Cuáles son las características que de él aprenden y cómo las aprenden? Es sorprendente y evidente que todos los seres se ven sujetos a continuos cambios en su ambiente de vida y que, para ajustarse a ellos y sobrevivir requieren no solo de una capacidad de adaptación fisiológica sino también de cierta versatilidad conductual que les permita responder adecuadamente, aprendiendo las relaciones de los fenómenos que componen su hábitat.

Un carácter conductual es tan parte del fenotipo como cualquier otro carácter y, por lo tanto, está sujeto a la selección natural. De hecho la conducta hace que los animales no solo sean un recipiente pasivo de la selección sino que activamente respondan a ella, al determinar, hasta cierta medida, el ambiente que los afecta. La conducta puede escudar otros caracteres de la selección o puede darle cierta dirección a la selección, como en el caso de la selección de caracteres sexuales de los machos por las hembras y, trascendente a la especiación, puede iniciar cambios en el nicho ecológico que ocupa una población (Futuyma 1998).

El aprendizaje es la forma a través de la cual un organismo adquiere conocimiento a cerca de su medio. La experiencia del medio que un organismo tiene puede, a través del aprendizaje, modificar su respuesta conductual (Kupfermann 1991a). Es una larga y polémica discusión si los animales nacen sabiendo o tiene que aprender pero, como en casi todo, no se trata de una u otra opción sino de ambas (Hudson et al 1998a). El conjunto de respuestas que un organismo presenta como resultado de su genotipo se van modificando a través de su vida por la experiencia. Cada individuo tendrá una historia de vida diferente y que requiera de él una modificación más o menos fina de los patrones conductuales posibles con los que cuenta de forma innata.

La conducta de un individuo y su capacidad de aprender dependen del medio en el cual se encuentra y de la información que pueda obtener de él. La percepción química, y en particular el olfato, es un medio a través del cual los organismos no solo obtienen información a cerca de su entorno abiótico sino también de sus conespecíficos y de otras especies. Una forma de interacción mediada principalmente por el olfato es la relación madre-cría en el conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*. Tomando esta interacción como muestra el presente trabajo pretende comenzar a esclarecer cuáles son los estímulos relevantes que permiten a los gazapos responder a su madre, amamantarse efectivamente y aprender olores asociados a ella.

En su inicio este trabajo pretendía evaluar los mecanismos fisiológicos que subyacen al aprendizaje olfativo de los gazapos neonatos pero quedó claro desde un principio que, para estudiar la fisiología de una conducta, primero debes conocerla con la mayor precisión posible, dentro del contexto natural en la que el animal la presenta. Para entender cómo los gazapos reúnen la información que posteriormente resulta en el aprendizaje olfativo, es preciso saber cuál es la información que perciben y cuál es relevante para el proceso.

A continuación se presenta una breve introducción sobre el olfato y el aprendizaje neonatal que pretende enmarcar éste trabajo dentro del contexto biológico del cual emerge.

### 1.1 El olfato

Como humanos dependemos principalmente de nuestros sentidos más desarrollados, la vista y el oído. Sin embargo para muchos otros seres vivos la fuente primaria de información son las señales químicas. Desde los mohos deslizantes hasta los elefantes dependen de este tipo de señales para sobrevivir (Agosta 1992).

La percepción química es el medio de interacción evolutivamente más antiguo entre un organismo y su ambiente. Las bacterias pueden responder eficientemente ante diferentes medios químicos, desplazándose hacia los nutrientes y evitando ambientes tóxicos. Muchas plantas y hongos usan estas señales para atraer a polinizadores y dispersores. Desde protozoarios hasta vertebrados los animales hacen uso de sus sentidos químicos para detectar alimento y a animales de otras especies, como puede ser un depredador. Los sentidos químicos también permiten a los organismos comunicarse entre sí mediante la emisión y percepción de señales. Uno de los usos más extendidos de las señales químicas es la comunicación intraespecífica (Agosta 1992). Alrededor de 1930, Martín Lüscher y Peter Karlson acuñaron el término feromona para este tipo de señales usadas entre específicos. Posteriormente Beauchamp y sus colaboradores (1976) especificaron más esta definición. Una feromona es tal si cumple las siguientes cinco características: 1) es un estímulo químico simple, 2) la respuesta que induce debe ser estereotipada y tener una función clara para el individuo que la ejerce, 3) esta respuesta solo puede ser inducida por un solo estímulo (selectividad química de la respuesta), 4) la respuesta debe ser especie específica (especificidad filogenética) y 5) la respuesta debe ser independiente al aprendizaje postnatal.

Las feromonas son empleadas de muchas maneras y a través de todos los Phyla. Permiten la unión de gametos nadadores y la conjugación en bacterias. También se emplean como señales de alarma, para atraer a una pareja, para localizar alimento, para indicar una camino a seguir, para generar la eclosión, como señales de agrupamiento, de cooperación, de engaño, de cortejo y de ahuyentamiento. También se usan para identificar a los individuos con quienes existe un parentesco (Agosta 1992).

El olfato aparece muy temprano en la evolución de los vertebrados (Maclean 1969). Para la mayoría de los mamíferos, las señales químicas, incluidas las feromonas, son una de las principales vías de comunicación (Alberts 1976). En particular en esta clase animal, la percepción de señales químicas se lleva a cabo a través de los sentidos del gusto, el olfato y el nervio trigémino (Finger y Silver 1987)

En los mamíferos, a diferencia de otros sentidos como la vista y el oído, los órganos perceptuales olfativos envían la mayor parte de sus aferentes directamente a la paleocorteza, mediante algunos relevos sinápticos pero sin pasar a través del tálamo. Solo la información que pasa a través del tubérculo olfativo llega al tálamo y de ahí a la corteza orbitofrontal donde se lleva a cabo la percepción consciente de los olores. El resto de las aferentes olfativas llegan directamente a la corteza piriforme, la amígdala, a la corteza entorhina y al hipocampo. Por ello, el olfato está íntimamente ligado al sistema límbico en donde se regulan mecanismos básicos del metabolismo y la homeostasis y que está asociado con las respuestas emotivas (Kupfermann 1991b).

Dentro de los mamíferos, la conducta de animales individuales y de poblaciones enteras se encuentra fuertemente modulada por eventos olfativos. El olfato juega un papel muy importante en las respuestas sexuales, afectivas y de forrajeo ya que se emplea para identificar parejas, enemigos y comida. A pesar de que en *Homo sapiens* esta función no parece tan desarrollada, varios estudios han demostrado que los humanos son capaces de distinguir, por ejemplo, el olor de sus parejas y de sus hijos (Hickman et al 1996) y que los compuestos presentes en el sudor, tanto de mujeres como de hombres, son suficientes para generar la sincronía de los ciclos menstruales de mujeres que, en grupo, son presentadas por un tiempo razonable a estos estímulos (Mc Clintock 1971, Stern y Mc Clintock 1998). El uso de perfumes y fragancias aún desde la civilización egipcia resalta la importancia, quizás inconsciente, que este sentido tiene para nosotros. Además, cabe resaltar que la historia de la higiene y la salud han estado siempre muy relacionadas con el olfato (Doty 1995).

#### 1.1.2 En mamíferos neonatos

Siendo el olfato tan trascendente para la supervivencia y perpetuación de tantas especies, la pregunta de cómo se origina y desarrolla el sentido del olfato se vuelve relevante. La importancia de éste sentido en relación a la conducta es todavía más evidente cuando se observan las condiciones a las que se ven expuestos los mamíferos altriciales durante los primeros días de vida. En general nacen con los ojos y oídos cerrados y una capacidad motora limitada. Son totalmente dependientes de su madre, tanto en términos de alimentación como de cuidados. Tal es el caso por ejemplo de las ratas, los hamsters (Alberts 1976) y los conejos (Hudson et al 1998a) aunque, para estos últimos, los cuidados maternos son muy limitados.

Los mamíferos neonatos dependen en gran medida de su capacidad olfativa para responder a la madre, localizar los pezones, adherirse a ellos y mamar. Para ello presentan mecanismos neurales redundantes que les permiten percibir y en dado caso aprender aún cuando su sistema nervioso no está del todo desarrollado o si los estímulos externos son muy degradados (Leon 1992). Esto implicaría que aprenden pocas cosas pero de manera muy robusta, aunque algunas de estas respuestas específicas tempranas se extingan con el tiempo y al maduración (Alberts 1976, Kindermann et al 1994). Ante el poco desarrollo de otros sentidos, es posible que el olfato conforme el principal panorama de estos recién nacidos.

Eliminar la percepción de estímulos olfativos de los neonatos irrigando la mucosa nasal con sulfato de zinc impide a los gazapos (Schley 1977, Hudson y Distel 1986) y a las ratas neonatas (Alberts 1976) encontrar los pezones y adherirse a ellos. Por su parte los bebés humanos son capaces de reconocer y preferir el olor de sus madres cuando son presentados con olores de otras mujeres en estado lactante. (Schaal 1988). Conforme los neonatos maduran y se desarrollan otros sentidos, la importancia del olfato para sostener la relación con la madre decrece. Sin embargo su importancia es crítica durante los primeros días en los cuales los neonatos establecen sus relaciones filiales (Leon 1992) y en los cuales se determina en gran medida su posterior supervivencia (Drummond et al 2000).

Además del papel que el olfato juega durante la etapa postnatal, también tienen efectos a largo plazo sobre las respuestas olfativas del adulto. Las señales olfativas presentes durante el desarrollo pueden proveer información valiosa y relevante para la sincronización, el comienzo y la dirección de actividades como la maduración, el crecimiento y la socialización. Por ejemplo, la presencia de orina o heces fecales de individuos maduros del sexo opuesto puede atrasar o adelantar el crecimiento y maduración de las ratas (Vandenbergh 1969, Mc Clintock 1983). Lo que determina cuáles son los estímulos olfativos a los que responderán los adultos no es meramente un componente genético. La experiencia, y en particular la experiencia temprana, juega un papel importante en la modulación de estas respuestas. Estas conclusiones se basan, entre otros, en trabajos en los cuales los gazapos desarrollan preferencia por alimentos ingeridos por sus madres durante el embarazo y estas preferencias se mantienen aún en la vida adulta (Hudson y Altbäcker 1994, Altbäcker et al 1995). Un estudio en humanos (Haller et al 1999), posible gracias a una casualidad alimenticia, demostró que también los adultos prefieren olores asociados a su alimentación temprana. Se ha observado que también para nuestra especie probablemente las experiencias olfativas tempranas condicionan no solo las preferencias olfativas adultas sino también la capacidad misma de percibir olores (Distel et al 1999, Hudson 1999).

## 1.2 Aprendizaje olfativo

Como ya se mencionó, el aprendizaje es la modulación del sistema nervioso a través de la experiencia (Squire 1986). Esta modulación normalmente puede observarse en las posteriores conductas de un individuo al enfrentarse de nuevo al medio donde obtuvo esta experiencia. El aprendizaje, como parte de la conducta, se puede observar directamente en el campo, como lo hicieron en un principio los fundadores de la etología, Lorenz, von Frisch y Tinbergen (y lo siguen haciendo muchos etólogos hoy), hecho que permite observar aprendizajes relevantes para los animales en su propio medio o se puede, como parte del método científico, manipular la circunstancia de los animales para observar ciertas características relevantes, ya sea para la respuesta del animal a su entorno o para conocer los mecanismos mismos del aprendizaje, entre otros. El estudio clásico del aprendizaje a sido muy desarrollado en el campo de la psicología y métodos de esta disciplina se han aplicado mucho en la biología (por ejemplo: Blass y Teicher 1980, Pedersen et al 1982, Johanson et al 1984, Hudson 1985, Sullivan y Hall 1988, Wilson y Sullivan 1994, Brennan y Keverne 1997).

El aprendizaje generalmente consta de la identificación de un estímulo, de la relación entre estímulos o de la relación entre estímulos y respuestas por parte de un individuo. La experiencia que éste sujeto tendrá en un momento puede ser evaluada en un momento posterior a través de analizar los cambios en su conducta (Rescorla y Holland 1982). Cuando un animal aprende a identificar un estímulo o a relacionarlo con otros estímulos para más tarde responder a él, cualquier elemento presente durante esa asociación que cambie la probabilidad de la posterior capacidad de respuesta del sujeto, se conoce como reforzador (Dunham 1975). Los reforzadores pueden aumentar (recompensa) o disminuir (castigo) la respuesta según sean percibidos por el individuo que aprende.

El sistema olfativo, a diferencia de otros sistemas preceptuales, presenta un problema singular: el mundo químico es altamente complejo e impredecible, a diferencia de, por ejemplo, las longitudes de onda captadas mediante la visión o el oído. Los olores comunes son mezclas de varios volátiles. Esto presenta al sistema con el problema de mapear características primarias de los estímulos olfativos. En este contexto, el aprendizaje confiere al sistema la flexibilidad necesaria para que el individuo obtenga de su medio la información más trascendente para él, robusteciendo la respuesta a ciertos estímulos ecológicamente relevantes (Hudson 1999).

### 1.2.1 Aprendizaje olfativo en conejos neonatos

Varios estudios demuestran aprendizaje olfativo en adultos, por ejemplo, de ovejas y ratones, enmarcados en eventos de vida particularmente relevantes para la supervivencia como son el apareamiento o el establecimiento de relaciones madre-cría. Las ratonas aprenden a reconocer la feromona de su pareja

y, ante la presencia de otros machos, pueden interrumpir su embarazo (revisado por Brennan y Keverne 1997). Las ovejas aprenden a reconocer el olor de sus hijos durante las primeras horas postparto (revisado por Brennan y Keverne 1997)

Sabemos que los muchos mamíferos neonatos dependen en gran medida del olfato para sobrevivir. Las ratas son capaces de aprender olores novedosos asociados con estímulos táctiles, inyecciones de leche y hasta choques eléctricos leves (Wilson y Sullivan 1994). Los gazapos por su parte pueden aprender olores asociados al amamantamiento en un solo ensayo (Hudson 1985, Kindermann et al 1991, 1994, Allingham et al 1999) así como los humanos neonatos aprenden olores asociados a la succión e ingesta (Schaal 1988, Leon 1992, Haller et al 1999, Coyle et al 2000). Los corderos (Goursaud y Nowak 1999), los hamsters (Devor y Scheider 1974), los venados (Müller-Schwarze y Müller-Schwarze 1971) y los monos ardilla (Kaplan y Cubicciotti 1980) también son capaces de aprender olores durante los primeros días postparto. Muchos de estos aprendizajes tienen una relevancia adaptativa al estar asociados a la madre y el ambiente del nido ya que aprender estos olores les permite a las crías establecer con mayor eficiencia los lazos filiales con ella (Leon 1992), así como responder de manera más adecuada ante el amamantamiento mismo como sería localizando, adhiriéndose y sujetándose a los pezones con mayor rapidez o eficiencia (Schley 1977, Hudson 1985).

El caso de los gazapos del conejo europeo es singular porque, a diferencia de los otros animales citados, reciben un cuidado limitado por parte de sus madres (Hudson y Distel 1982). Sin embargo, durante el único y breve amamantamiento diario, los gazapos pueden aprender un olor novedoso en tan solo un ensayo de alrededor de 3 min. Experimentalmente este aprendizaje a olores novedosos se puede evaluar con facilidad mediante la observación de una conducta robusta y estereotipada fácil de identificar llamada conducta de búsqueda de pezón (Hudson 1985, Kindermann et al 1991, 1994, Hudson y Distel 1995, Allingham et al 1999). Además manipular a los gazapos entre cada evento de amamantamiento no irrumpe la relación madre-cría ni interfiere en su desarrollo normal (Hudson 1985, Hudson y Distel 1995).

Estas características hacen del conejo europeo un modelo muy útil para el estudio del aprendizaje temprano. En particular, el hecho de que éste aprendizaje se lleve a cabo durante un periodo sensible (Kindermann et al 1994) y que esté asociado a la madre, lo hace muy interesante en términos adaptativos pues, como se explicó antes, para los mamíferos altriciales la capacidad de responder con flexibilidad ante el ambiente postparto puede ser determinante para su supervivencia y para moldear sus posteriores capacidades preceptuales y respuestas conductuales.



## 2. Antecedentes

### 2.1 Conducta maternal de la coneja

En los conejos el cuidado parental es solamente responsabilidad de la hembra. Los machos no aportan más que su información genética a los gazapos ya que no les proveen cuidados ni comida durante su desarrollo (revisado en Hudson y Distel 1989). Según Hudson y colaboradores (1998b) el ciclo de la conducta maternal se divide en tres fases: 1) embarazo y parto, 2) lactancia y 3) destete. Para el fin de este trabajo, se describirán únicamente las primeras dos fases.

#### 2.1.1 Embarazo y parto

La gestación dura aproximadamente 31 días. Alrededor de 3 a 2 días antes del parto las madres en condiciones naturales excavan una madriguera separada de la madriguera común (en el laboratorio preparan el nido en cajas especiales fabricadas con ese propósito). Entonces comienzan a coleccionar hierbas y pastos secos y a arrancarse el pelo del pecho para fabricar el nido (Deutsch 1957, Ross et al 1963, Hudson y Distel 1982, 1989, González-Mariscal et al 1994, Hudson et al 1997). Este proceso, así como toda la conducta maternal en general, tiene una regulación hormonal muy precisa y ampliamente estudiada como se expresa en los trabajos de Hudson y Distel (1984, 1990, 1995), González-Mariscal et al (1994, 1996), Jilge (1991), Jilge y Hudson (2001) y Martínez-Gómez et al (en prensa) entre otros. El parto generalmente sucede durante el día (Hudson et al 1995) y es un evento muy rápido en el cual las hembras pueden parir hasta 10 o más crías en menos de 15 min (Hudson et al 1999). Conforme nacen, la coneja las va lamiendo, limpiándolas de los fluidos uterinos y comiéndose las placentas.

Por su parte las crías al nacer se dirigen inmediatamente hacia los pezones de la madre, expresando una conducta conocida como la conducta de búsqueda de pezón (Hudson y Distel 1983). No todas las crías logran amamantarse en este primer momento ya que, una vez que ha terminado la labor de parto, la coneja sale abruptamente del nido (o de la caja nido en condiciones de laboratorio) y cierra la madriguera, dejando a los gazapos solos hasta el día siguiente (Deutsch 1957, Hudson y Distel 1982, Broekhuizen y Mulder 1983, Jilge 1993, Hudson et al 1999). A partir de este momento las madres regresarán a sus madrigueras cada 24 h a amamantar a sus crías durante únicamente 3 min (en promedio; Deutsch 1957, Zarrow et al 1965, Lincoln 1974, Hudson y Distel 1982) hasta el día del destete que suele presentarse alrededor del día 25 postparto si la madre ha quedado embarazada durante el característico estró postparto y si no, esta fecha se recorre varios días más (Lincoln 1974, Hudson et al 1995, 1996, 1997).

### 2.1.2 Amamantamiento

La conducta de amamantamiento es como sigue: aproximadamente 24 h después del parto o del último amamantamiento, las conejas entran a la madriguera o caja nido y se posicionan inmóviles sobre los gazapos, sin brindarles ningún tipo de asistencia ni acicalamiento. La rápida adhesión de los gazapos a los pezones en segundos, desata un reflejo neuroendócrino en la madre, común a otros mamíferos, en el cual la succión estimula la liberación de oxitocina al flujo sanguíneo y esta a su vez estimula la liberación de la leche (Summerlee et al 1986, Wakerley et al 1994). Después de alrededor de 3 min de amamantar a sus crías, abruptamente salen del nido. En ese momento las crías se desprenden de los pezones para no ser arrastradas por la madre (Hudson y Distel 1982, González-Mariscal et al 1996, Hudson et al 1996).

Durante la visita de amamantamiento los gazapos se adhieren a varios pezones diferentes, cambiando de uno a otro y perdiendo así cierta cantidad de tiempo de succión y por lo tanto de ingesta de leche. En promedio el tiempo neto de succión por gazapo durante los 3 min que viene la madre es de solo 110 s (Drewett et al 1982, Hudson y Distel 1983). A pesar de la breve exposición que tienen las crías a la madre y por lo tanto a pesar de la reducida posibilidad de ingerir leche por día, en los 25 días promedio que dura el periodo de amamantamiento (esto es un total de alrededor de 45 min de succión), logran aumentar hasta doce veces su peso (Hudson y Atlbäcker 1994, Hudson et al 1996).

### 2.2 Estrategias de los gazapos

Como animales altriciales, los gazapos nacen muy inmaduros: desnudos, con ojos y oídos externos cerrados y una coordinación motora muy pobre. Es hasta el séptimo u octavo día que pueden responder a estímulos auditivos y cambios de luz y es solo hasta los días 13 al 18 que pueden regular su temperatura corporal y mejorar notablemente su coordinación motora (reportado en Hudson y Distel 1982). Entonces, ¿Cómo es que logran localizar los pezones con tal rapidez y beber hasta un 25% de su peso por sesión de amamantamiento (Lincoln 1974, Hudson et al 1996)? ¿Cómo logran transitar hacia la independencia alimenticia con tan escasa atención materna? Existen al menos tres mecanismos que les permiten hacerlo: en primera instancia, y al que incumbe directamente esta tesis, es el aprendizaje de olores asociados a la madre. Otros dos mecanismos que se mencionarán primero son: la sincronía circádica que establecen los gazapos con la madre y la expresión de una conducta innata de búsqueda de pezón desatada en los gazapos por el contacto con una feromona materna.

### 2.2.1 Anticipación circádica del amamantamiento

Uno de los mecanismos que usan los gazapos para poder responder adecuadamente a la conducta de amamantamiento de las conejas es establecer una sincronía circádica con ellas. Se ha demostrado que los gazapos anticipan el arribo de su madre al nido ya que este es diario y muy regular (Hudson y Distel 1982, 1989, Jilge 1993, Allingham et al 1998, Jilge y Hudson 2001). Durante el tiempo que permanecen solas, normalmente las crías se sumergen en el material del nido y permanecen todas juntas y quietas. Sin embargo, entre una y dos horas antes del amamantamiento hay una elevación en su temperatura corporal y se descubren, saliéndose del material del nido hacia la superficie. Su actividad general aumenta y responden activamente con vocalizaciones y hasta brincos a la cercanía de estímulos táctiles como puede ser la mano de un experimentador (Hudson y Distel 1982, Escobar et al 2000, Jilge y Hudson 2001). Cuando la madre llega al nido los gazapos se encuentran listos para buscar los pezones y adherirse a ellos. Tras terminar de mamar, todos orinan simultáneamente y vigorosamente se sumergen de nuevo en el material del nido, proceso que les toma entre 10 y 15 min y que les permite secarse y reagruparse quietos hasta el día siguiente. Este patrón de activación es consecuencia de un ciclo circádico endógeno y no de una activación por falta de alimento (Hudson y Distel 1982, 1989, Jilge 1993, Allingham et al 1998, Escobar et al 2000, Jilge y Hudson 2001).

Esta conducta anticipadora y el emerger a la superficie antes de la llegada de la madre es trascendental para la sobrevivencia de los gazapos. Cubrirlos experimentalmente con el material del nido justo antes del amamantamiento provoca que tengan muchas dificultades para encontrar y adherirse a los pezones y también irrumpe la conducta de amamantamiento normal de las conejas, hechos que resultan en reducidas ingestas de leche y hasta en la muerte por inanición (Hudson y Distel 1982, Coureaud et al 2000).

### 2.2.2 Conducta de búsqueda de pezón

Un segundo mecanismo evolutivo que ha permitido a los conejos desarrollar este tipo de conducta materna es la notoria capacidad que tienen los gazapos para localizar los pezones y adherirse a ellos en un tiempo muy corto (Hudson y Distel 1983, Hudson et al 1996). Cuando la madre entra al nido los gazapos rápidamente expresan una conducta motora muy estereotipada, la conducta de búsqueda de pezón (Hudson y Distel 1983, Distel y Hudson 1984, Hudson 1985), que consiste en alzar sus cabezas contra el vientre de la madre y desplazar su hocico en zig-zag sobre la superficie ventral, haciendo un movimiento incisivo como el de una aguja en una máquina de coser, hasta que encuentran un pezón. Lo que desencadena con tal rapidez y efectividad la conducta de búsqueda de pezón en los gazapos es una feromona materna que los gazapos detectan a través del bulbo olfativo principal (Distel y Hudson 1985,

Hudson y Distel 1986,1995). El hecho de que la sustancia que desata en los gazapos la conducta de búsqueda de pezón sea una verdadera feromona se desprende de una serie de trabajos que brevemente se revisarán a continuación.

Se ha observado que los gazapos presentan esta conducta de búsqueda de pezón siempre que se les coloca sobre conejas que hayan alcanzado la madurez sexual, inclusive si estas son de otra raza (Hudson, comunicación personal) pero la respuesta es aún más notoria cuando las conejas se encuentran embarazadas o lactando (Hudson y Distel 1984,1990). Sin embargo, esta conducta no se presenta si los gazapos son expuestos a hembras ovariectomizadas o a otras especies como gatos, ratas, conejillos de indias o inclusive liebres durante el periodo de lactancia (Müller 1978, Hudson y Distel 1984, 1990, Hudson 1985). Esto implica que el estímulo materno que desencadena la conducta de búsqueda en los gazapos es especie específica y su producción está relacionada con el estado hormonal de las hembras.

Hudson y Distel (1983) y Hudson (1985) observaron que eran él o los estímulos olfativos provenientes del vientre de las hembras la señal esencial no solo para iniciar en los gazapos la conducta de búsqueda de pezón sino también para que éstos pudieran sostenerla durante su encuentro con una hembra lactante. Además, Schley (1981) por su parte había observado que estas claves olfativas también debían estar presentes para que los gazapos pudieran adherirse a los pezones. No afectaba significativamente a la conducta de búsqueda si se rasuraba el vientre de las madres o se creaba un gradiente negativo de temperatura al enfriar los pezones. Sin embargo, si se cubría el vientre de la madre con cinta adhesiva, dejando descubiertos únicamente los pezones, los gazapos no presentaban la conducta de búsqueda y solo se adherían a los pezones cuando se encontraban justo encima de ellos (Hudson y Distel 1983). De esto se concluyó que la o las claves olfativas que desencadenaban y mantenían la conducta de búsqueda de pezón eran más fuertes conforme estaban más cerca de los pezones y por lo tanto servían como guía hacia ellos. Para determinar que en efecto se trataba de estímulos olfativos se hicieron estudios para demostrar que los gazapos son incapaces de adherirse a los pezones si se les provoca anosmia mediante la ablación de los bulbos olfativos (Distel y Hudson 1985) o mediante la irrigación de la mucosa nasal con sulfato de zinc (Hudson y Distel 1986).

A través de estos estudios se concluyó que, al generar una respuesta confiable y estereotipada y ser especie específica, la señal olfativa que desencadena la conducta de búsqueda de pezón es una feromona según la definición de Beauchamp et al (1976) y según Hudson et al (1998a). Según esta definición la reacción de la mayoría de los mamíferos a las feromonas depende en parte de la experiencia que hayan tenido con ellas. Es interesante notar que los gazapos reaccionan a la feromona materna con la conducta de búsqueda de pezón no solo inmediatamente después del parto como se describió en un párrafo anterior sino que también se comportan

normalmente ante una madre lactante cuando son extraídos por cesárea un día previo al día del parto (Hudson 1985) e inclusive cuando son expuestos por primera vez a una madre habiendo sido criados a mano durante los primeros cinco días de vida (Schley 1976, 1981). Es posible que la respuesta conductual de los gazapos sea consecuencia de la exposición al ambiente uterino y por tanto sea un aprendizaje prenatal. También es cierto que, aunque los gazapos neonatos no tienen que aprender a reconocer la feromona, su respuesta a ella sí mejora con el tiempo y la experiencia a lo largo de los primeros días de vida (Müller 1978, Distel y Hudson 1984). Ya que es a través de esta señal olfativa que los gazapos pueden efectivamente reconocer a la madre y alimentarse, de ella depende su vida. De hecho, la dependencia que tienen los gazapos a la feromona explica el por qué es tan difícil criar conejos a mano (Appel et al 1971, Schley 1976) y el por qué los gazapos son totalmente incapaces de succionar un pezón si se les produce anosmia quirúrgicamente (Schley 1977, 1981, Distel y Hudson 1985, Hudson y Distel 1986).

La respuesta de los gazapos a la feromona es innata en el sentido de que no tienen que aprenderla tras el parto. Sin embargo, los conejos neonatos son capaces de aprender a reconocer olores asociados al evento de amamantamiento muy rápidamente y luego responder a ellos como si se tratara de la feromona misma.

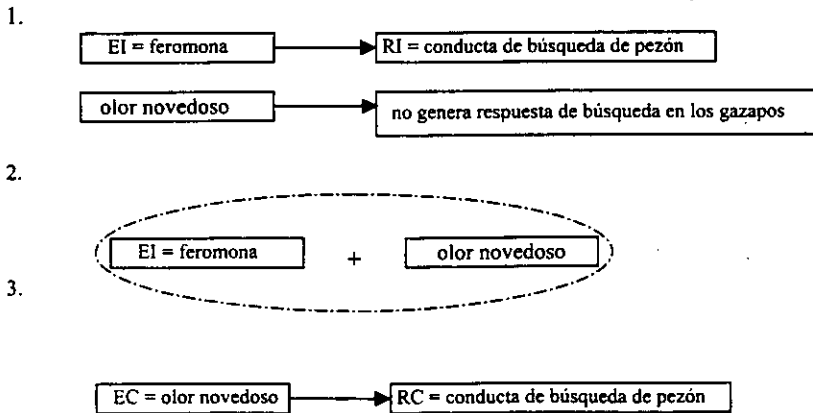
### 2.3 Aprendizaje olfativo en los gazapos

Si antes del amamantamiento el vientre de la madre es perfumado con un olor novedoso como puede ser el perfume Chanel No. 5, los gazapos entre 1 y 5 días de nacidos, aprenden a responder al perfume como si fuera la feromona (después de *una* sola exposición), expresando la conducta de búsqueda de pezón sobre hembras ovariectomizadas, gatas (Hudson 1985) e inclusive una piel curtida de conejo perfumada (Kindermann et al 1991, 1994).

Este proceso de aprendizaje puede describirse como un condicionamiento clásico en el cual se aparece en un mismo momento un estímulo incondicionado (feromona) que genera una respuesta estereotipada y confiable en el organismo (conducta de búsqueda de pezón) con otro estímulo, el estímulo condicionante (olor novedoso) que es un estímulo neutro (Rescorla y Holland 1982; Fig. 1). Después de este apareamiento el sujeto responde al estímulo condicionante como lo hiciera con anterioridad al estímulo incondicionado como se esquematiza en la Figura 1.

Los gazapos pueden ser condicionados a diferentes olores como son un perfume comercial, aceite de alcanfor disuelto en alcohol, aroma de citral sin alcohol o jugo de ajo (Hudson 1985, Hudson y Distel

1986, 1987, Allingham et al 1999). Tras una sola exposición a este olor durante el evento de amamantamiento, 24 h después del mismo presentan la conducta de búsqueda de pezón. De hecho, aún después de varios días de haber sido condicionados y sin más exposiciones ni al olor ni a la madre (criados a mano tras un solo amamantamiento con el olor), los gazapos siguen respondiendo a éste con la conducta de búsqueda (Ivanitskii 1958, Hudson 1985). Esto demuestra que el aprendizaje es muy robusto y que inclusive suspender el proceso de amamantamiento no lo irrumpe. Pero cabe mencionar que este tipo de aprendizaje, como muchos otros aprendizajes neonatales, está acotado a un periodo sensible (Hudson 1993b, Brennan y Keverne 1997, Hudson et al 1998a) que abarca desde el día del nacimiento hasta aproximadamente el día 5 postparto (Kindermann et al 1994).



**Fig. 1** Condicionamiento clásico a olores durante el amamantamiento en gazapos neonatos. En un primer momento, antes del condicionamiento, la feromona desata en los gazapos la conducta de búsqueda de pezón cada vez que se enfrentan a ella y el olor novedoso no genera ningún tipo de respuesta. En un segundo momento, durante el condicionamiento, se expone a los gazapos simultáneamente a la feromona y al olor novedoso mientras se lleva a cabo el amamantamiento. En un tercer momento (prueba de evocación), los gazapos son presentados únicamente con el olor novedoso y responden a él como a la feromona, con la conducta de búsqueda de pezón. (EI = estímulo incondicionado, RI = respuesta incondicionada, EC = estímulo condicionante, RC = respuesta condicionada)

### 2.3.1 Estímulos relevantes para el aprendizaje de olores asociados al amamantamiento

El condicionamiento clásico puede entenderse, más que como la transferencia del control de un reflejo de un estímulo a otro (EI a EC), una manera en que los organismos aprenden las relaciones

causales de su medio (Rescorla y Holland 1982). Esta definición nos permite pensar en el condicionamiento de los gazapos como un medio a través del cual éstos animales aprenden a responder más adecuadamente a un entorno que cambia y que presenta ciertas características y no solo como la transmisión del "mando" que tiene un estímulo sobre cierta una conducta a otro estímulo diferente.

Definimos a la feromona como el estímulo incondicionado. En múltiples trabajos el estímulo incondicionado es suficiente por sí mismo para que se establezca el condicionamiento, esto es, es el reforzador del aprendizaje (por ejemplo: Johanson y Hall 1982, Pedersen et al 1982, Sullivan y Hall 1988, McLean et al 1993). Pero si para condicionar a los gazapos apareamos la feromona sola con el olor novedoso, sin todos los estímulos que acompañan al amamantamiento, esto no parece generar una relación causal feromona-olor y no hay aprendizaje (Hudson comunicación personal, observación personal). Esto nos dice que hay otros estímulos presentes que permiten que el aprendizaje se consolide a nivel del sistema nervioso de los gazapos. De hecho esto no es sorprendente en términos de que se trata de un evento de vida que naturalmente alberga gran complejidad y en el que coexiste una mezcla de estímulos sensoriales que afectan a los gazapos.

Entonces, a pesar de que los gazapos en efecto pueden ser condicionados a un olor novedoso, todavía no se sabe cuáles son las características del evento de amamantamiento que permiten esta asociación olor novedoso-amamantamiento. No se sabe cuáles son los estímulos presentes, particularmente aquellos provistos por la madre a los gazapos (además de la posible participación de la feromona), que funcionan como reforzadores para el aprendizaje.

Se ha observado que el olor artificial en sí no es suficiente para estimular la conducta de búsqueda y por lo tanto se puede descartar como reforzador (Hudson 1985). Tampoco participan como reforzadores, inclusive ni siquiera como guías hacia los pezones, el líquido amniótico de la madre ni su saliva, ni la saliva de los hermanos (Hudson 1985).

Como podría inferirse con base en la finalidad claramente alimenticia del amamantamiento, en algunos estudios en ratas, la leche parece ser necesaria o al menos suficiente para reforzar el aprendizaje (Johanson y Hall 1979, Johanson et al 1984, Sullivan y Hall 1988) pero, según observaciones de Hudson (1993a), la leche no parece jugar un papel importante para el aprendizaje de los gazapos a olores asociados con la respuesta de búsqueda de pezón en particular. Diferentes ejemplos de aprendizaje logrados con amamantamientos sin leche como reforzador también están reportados para corderos (prueba de preferencia, por Goursaud y Nowak 1999) y para ratas (conducta de aproximación, por Amsel et al 1976, prueba de discriminación lateral por Kenny y Blass 1977 y prueba de preferencia ante un olor novedoso, por Brake 1981).

Se ha observado que, por su parte, estímulos somatosensoriales como la estimulación táctil (Pedersen et al 1982, Sullivan y Hall 1988, McLean et al 1993), el calor (Pedersen et al 1982) e inclusive

choques eléctricos leves (Camp y Rudy 1988) suelen jugar un papel importante para el aprendizaje olfativo en las ratas neonatas. Parece ser que lo que caracteriza a todos estos estímulos es que generan una activación conductual en los animales al momento del condicionamiento (Wilson y Sullivan 1994). Esta activación conductual desencadenada por ciertos estímulos tiene como resultado un incremento en la manifestación de la conducta aprendida y, según Dunham (1975), esa es precisamente la definición de un estímulo reforzador. Se reportado también que en ratas, gatos y conejos neonatos la mera ausencia de percepción sensorial perioral impide aún la adhesión a los pezones (Hofer et al 1981, Larson y Stein 1984, Distel y Hudson 1985), hecho que apunta hacia la relevancia que pudiera tener la estimulación somatosensorial de esta zona tan importante y tan altamente inervada en los mamíferos (Woolsey 1967, Van der Loos y Woolsey 1973, Woolsey y Wann, 1976).

En resumen, a pesar de los múltiples trabajos antes citados, aún se sabe poco sobre los estímulos relevantes para el aprendizaje olfativo de los gazapos durante el amamantamiento. Conocer cuáles son estos estímulos permitiría la posterior investigación de cómo y con que herramientas sensorimotoras los gazapos, como modelos de un mamífero neonato, se enfrentan a su medio durante el crucial momento de amamantamiento. También haría posible dilucidar cuáles son las rutas o mecanismos neurales que acontecen durante un aprendizaje asociativo de esta índole.

## 2.4 Ventajas y faltantes del paradigma experimental

### 2.4.1 Ventajas

El paradigma desarrollado por Hudson y colaboradores usando el modelo del conejo tiene varias características que lo hacen muy conveniente para el estudio de los procesos tempranos en el desarrollo y en particular sobre el aprendizaje:

- El aprendizaje olfativo de los gazapos es robusto y muy fácil de identificar.
- Como los animales no requieren del cuidado materno son fácilmente manipulables sin que se interrumpa la relación madre-cría.
- El aprendizaje de un solo evento en los conejos permite examinar sus componentes temporales: adquisición, consolidación y evocación, facilitando la identificación de los procesos neurales que los subyacen.
- Permite acceder al aprendizaje a edades muy tempranas, evaluar el desarrollo y las particularidades del sistema nervioso neonato.
- Los gazapos son muy resistentes a la intervención quirúrgica y por lo tanto ofrecen un buen modelo para estudios neuroetológicos en un mamífero en desarrollo.



Sin embargo, como todo paradigma experimental, este modelo presenta una serie de faltantes que impiden el aprovechar en mayor medida un modelo verdaderamente singular para el estudio del aprendizaje neonatal, las relaciones madre-cría y en general el desarrollo temprano.

#### 2.4.2 Faltantes

- En los estudios realizados hasta ahora, falta una descripción de la conducta de los gazapos durante el condicionamiento. Esto se debe a que el paradigma no permite controlar este evento y puede que esto sea una de las principales causas de la variabilidad notoria que se presenta entre los sujetos.
- Se requiere un mayor control de los gazapos durante el condicionamiento particularmente con el fin de controlar y estandarizar este procedimiento y para poder manipular los estímulos que eventualmente resulten ser los reforzadores de este aprendizaje.
- Se requiere también de un análisis y descripción más precisos de la conducta de los gazapos durante la prueba de evocación ya que esto permitiría elaborar una medida de evaluación que pueda diferenciar entre los distintos efectos de intervenciones quirúrgicas, farmacológicas o conductuales sobre los gazapos.

Como resultado de múltiples trabajos realizados hasta ahora sobre aprendizaje neonatal en mamíferos y en particular en el modelo del aprendizaje olfativo en el conejo, surgen varias dudas que aún quedan por resolver. Algunas de ellas motivadas por aquellos estudios y el presente trabajo de investigación son:

1. ¿Cómo afecta el desarrollo, en términos de la edad y el crecimiento de los gazapos, al aprendizaje olfativo?
2. ¿Qué condiciones internas (neurotransmisores, motivación) modulan el aprendizaje olfativo de los gazapos?
3. ¿Cuáles son las estructuras y los mecanismos cerebrales a través de los cuales se lleva a cabo este aprendizaje y la conducta que lo expresa?

Y, de particular relevancia para este estudio,

4. ¿Cuáles son los estímulos maternos necesarios para o que contribuyen a este aprendizaje en particular y de que manera participan en él?

### 3. Hipótesis

#### 3.1 Hipótesis general

Los diferentes estímulos provistos por la madre durante el amamantamiento contribuyen de manera aditiva al aprendizaje olfativo de los gazapos.

Durante el condicionamiento, conforme se retiren los diferentes estímulos maternos presentes se observará un decremento en el aprendizaje de los gazapos, expresado en una *disminución de* o un *cambio en* la ejecución de la conducta de búsqueda de pezón que los animales llevan a cabo al ser presentados tiempo después con el olor al que han sido condicionados durante el amamantamiento.

#### 3.2 Predicciones

- i. Si la madre despierta tiene un papel básicamente pasivo durante el amamantamiento, los gazapos podrán aprender un nuevo olor asociado al evento de amamantamiento sobre una madre anestesiada y que les provea de leche, de la misma manera en que lo hacen durante un amamantamiento normal en el nido.
- ii. Sobre una madre anestesiada, los diferentes estímulos presentes como la leche, la estimulación intraoral, la feromona y la estimulación táctil generada por el ejercicio de la conducta de búsqueda participarán de manera conjunta durante el condicionamiento pero diferirán en su capacidad de reforzar el aprendizaje:
  - a) Si la leche no tiene una participación principal como reforzador durante el condicionamiento de los gazapos, eliminarla tendrá como resultado un decremento en el aprendizaje de los gazapos pero éste no será significativo.
  - b) Sin leche, si la estimulación táctil generada por la conducta de búsqueda no tiene un papel principal como reforzador, eliminar adicionalmente la búsqueda pero permitir la adhesión a los pezones resultará en un decremento adicional en el aprendizaje pero este no será significativo.
  - c) Sin leche, si la estimulación intraoral puede ejercer un efecto reforzador predominante durante el aprendizaje, eliminar adicionalmente la adhesión y la succión de los pezones pero permitir el ejercicio de la conducta de búsqueda reducirá significativamente el aprendizaje.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Identificar cuáles son los estímulos maternos relevantes para el aprendizaje olfativo de los conejos neonatos durante el amamantamiento, esto es, cuál o cuáles de los múltiples estímulos sensoriales a los que se ven sujetos los gazapos durante este evento (durante el condicionamiento), participan como reforzadores de este aprendizaje, permitiéndole a los gazapos asociar el olor novedoso con el evento de amamantamiento y posteriormente responder a este olor como si fuera la madre lactante.

### 4.2 Objetivos particulares

- i. Repetir los experimentos de condicionamiento olfativo en el nido llevados a cabo por Hudson y colaboradores para establecer una base comparativa con estos estudios previos.
- ii. Desarrollar un paradigma experimental que permita observar, controlar y manipular el evento de condicionamiento.
- iii. Una vez establecido este nuevo paradigma de condicionamiento, generar nuevos métodos de análisis de la conducta durante la prueba de evocación con el fin de elaborar medidas más precisas que sean sensibles aún a respuestas gradadas en el aprendizaje.
- iv. Emplear este nuevo paradigma y su análisis para evaluar la participación de diferentes estímulos sensoriales presentes durante el evento de condicionamiento como reforzadores del aprendizaje: a) la conducta de la madre y otras propiedades del nido, inclusive la presencia de los hermanos, b) la ingestión de leche, c) la aprehensión y succión de los pezones y d) la conducta de búsqueda y la feromona materna.

## 5. Metodología

### 5.1 Animales

Se trabajó con un total de 128 gazapos entre 0 y 3 días de nacidos y 35 conejas de la raza chinchilla (Rabbit Farm, Edo. Mex, México). Todos los animales eran criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. a una temperatura promedio de 20°C. Con la finalidad de mantener a las hembras en estro durante todo el año (Hudson y Distel 1990), se estableció un ciclo de luz-oscuridad de 18:6 h (la luz se encendía a las 06:00 h). Los animales tenían acceso *ad libitum* al agua y alimento en croquetas (Harlan Teklad, Hi-Fiber Rabbit Diet, E.U.A.). Las conejas gestantes eran colocadas en jaulas maternas de acero inoxidable de 120 x 60 x 40 (altura) cm y provistas con una caja nido de PVC de 8 mm con medidas internas de 35 x 27 x 30 (altura) cm, cuyo suelo era cubierto de viruta (Harlan Teklad, Laboratory Grade Aspen Bedding) para que pudieran formar el nido, tres días antes del parto. La caja nido era opaca y estaba completamente cerrada salvo por un orificio circular de 14 cm de diámetro en uno de sus lados. Otro de sus lados era deslizante, de tal forma que pudiese abrirse y limpiarse adecuadamente después de removidos los gazapos o para la manipulación de los mismos dentro del nido (Fig. 2).

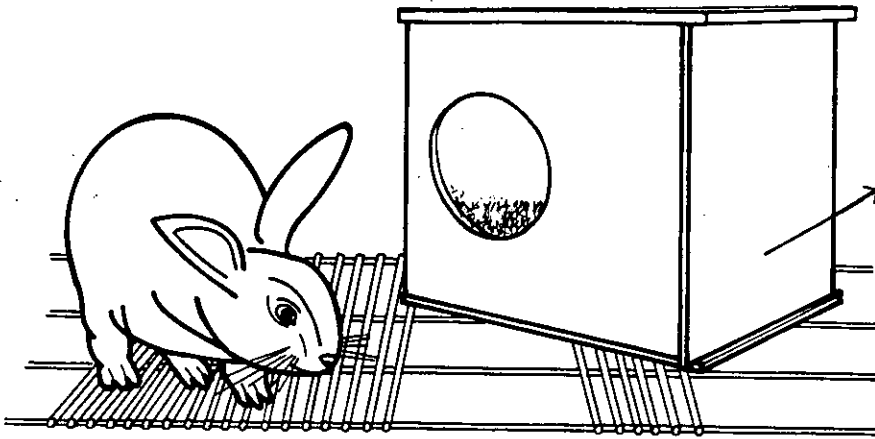


Fig. 2 Coneja en su jaula maternal, parada al lado de una caja nido.

## 5.2 Diseño experimental

Para formar los grupos experimentales se sincronizaban los partos de dos a tres madres para un mismo día. Las madres empleadas en los experimentos fueron aquellas que acababan de parir, con algunas excepciones en las cuales, por problemas metodológicos, se emplearon madres con una semana de haber parido. El día del parto se estableció como día 0 y a partir de este se contabilizaron los días siguientes como día 1, 2 y 3 postparto. Tras el parto, los gazapos eran removidos del nido, pesados y marcados para su posterior identificación con plumones indelebles de diferentes colores en las orejas. Debido a que los gazapos son difíciles de sexar de forma confiable a esta edad y dado que, en promedio, nacen un número equivalente de hembras y machos (Drummond et al 2000), el sexo de los sujetos no se consideró para este paradigma experimental.

Las camadas se redujeron a los seis gazapos más grandes para disminuir la varianza en el peso de los sujetos y asegurar su supervivencia hasta el fin de los experimentos. Los gazapos de diferentes camadas nacidos en un mismo día eran mezclados entre sí aleatoriamente para formar grupos de seis. La aleatorización se llevó a cabo para controlar por las posibles variaciones genéticas entre camadas y la variación entre las hembras lactantes, tanto en conducta maternal como en la cantidad de feromona y la cantidad y calidad de la leche.

Entre cada amamantamiento y/o sesión experimental los gazapos eran mantenidos en el laboratorio a temperatura ambiente, en cajas de cartón de 20 x 15 x 14 (altura) cm, tapadas con franela. En todo momento los animales en contacto con el perfume utilizado como estímulo condicionante permanecieron separados de aquellos sujetos que conformaban los grupos controles (no condicionados) y que no habían estado en contacto con el perfume, salvo durante la prueba de evocación.

Para evaluar el consumo de leche ingerida por sujeto en cada sesión cotidiana de amamantamiento, a partir del día 1 postparto los gazapos eran pesados antes y después de ser expuestos a la madre lactante. Los gazapos normalmente orinan durante o inmediatamente después de comer (Hudson y Distel 1982). Para controlar la variación debida a la pérdida de peso por esta micción, los gazapos eran miccionados manualmente antes de ser pesados y alimentados. La micción se estimulaba mediante la frotación de la zona urogenital con agua helada y una leve presión de la vejiga. El peso se evaluaba por medio de una balanza digital (Ohaus TS600S).

Todos los experimentos se desarrollaron alrededor de un paradigma de condicionamiento clásico según se describe por Hudson (1985). En total se generaron cinco experimentos diferentes. Los primeros tres de estos estuvieron constituidos por un grupo control (no condicionado) y un grupo experimental (condicionado). Los otros dos constaron solo de sujetos condicionados. Cada grupo (control o condicionado) se completó a un total de 16 sujetos provenientes de al menos cinco camadas diferentes. El condicionamiento constaba en exponer a los gazapos, en un solo evento de amamantamiento, a un

estímulo olfativo (perfume Chanel No. 5), aplicado previamente sobre el vientre de la madre. El aprendizaje de este estímulo olfativo se evaluaba mediante una prueba conductual de evocación 24 h después del condicionamiento en la cual se exponía a los animales al perfume (estímulo condicionante) en ausencia de la madre como se explicará con más detalle posteriormente.

Se eligió al perfume Chanel No. 5 como estímulo condicionante ya que es un estímulo complejo útil para este modelo (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986, 1987, Kindermann et al 1991, 1994) y con el fin de que los resultados de éste estudio fuesen comparables con todos los que sobre esta línea se elaboraron previamente.

Se elaboraron cinco experimentos en los cuales se evaluó:

1) *El aprendizaje de un estímulo olfativo durante el amamantamiento natural.* Elaborado como base para todo el desarrollo del estudio y para corroborar que era posible reproducir en nuestro laboratorio los resultados reportados previamente (Hudson 1985, Hudson y Distel 1986, 1987, Kindermann et al 1991, 1994, Allingham et al 1999).

2) *La posibilidad de llevar a cabo este evento de aprendizaje sobre una madre anestesiada, controlando, observando y manipulando el proceso de condicionamiento.* Llevado a cabo en condiciones controladas con la intención de poder manipular el aprendizaje al controlar los estímulos presentes (como número de veces que el sujeto tenía acceso a los pezones y el tiempo que podía permanecer adherido a ellos), reduciendo cualquier factor presente en el nido que no se pudiera observar ni controlar en la técnica de condicionamiento establecida previamente por Hudson y sus colaboradores. Específicamente como un primer paso en la identificación de los estímulos que refuerzan el aprendizaje, este experimento pretendió eliminar todos los estímulos provenientes de la madre despierta, de los hermanos de la misma camada y del material del nido.

3) *El papel de la leche como un estímulo reforzante durante el aprendizaje.* Elaborado como un segundo paso en la identificación de los estímulos que funcionan como reforzadores durante el aprendizaje. También se pretendió corroborar la utilidad del condicionamiento controlado elaborado en el experimento anterior para desarrollar estudios de este tipo, que en si conforman la base para, empleando este mismo modelo, el estudio de los mecanismos fisiológicos que subyacen al aprendizaje olfativo.

4) *El papel de la estimulación intraoral como estímulo reforzante durante el aprendizaje.* Siguiendo la misma línea, se pretendió evaluar el efecto que tiene la estimulación intraoral que reciben los gazapos al adherirse a los pezones durante el condicionamiento, sobre el aprendizaje.

5) *El papel de la conducta de búsqueda y la presencia de la feromona como estímulos reforzantes durante el aprendizaje.* Se pretendió evaluar el efecto que tiene el ejercicio activo de la conducta de búsqueda sobre la madre durante el condicionamiento en el aprendizaje olfativo y simultáneamente evaluar si la presencia de la feromona puede por sí sola producir que el aprendizaje se dé.

Todos los experimentos se efectuaron bajo el siguiente esquema:

*Día 0:* Nacimiento. Los gazapos eran removidos del nido al nacer, pesados, marcados y mezclados en grupos de seis sujetos como se explica con anterioridad. Una vez pesados y marcados se les mantenía en el laboratorio hasta el día siguiente.

*Día 1:* Establecimiento de horarios. Los gazapos se llevaban a amamantar entre las 10:00 y 12:00 h. El horario establecido en este día era el mismo en el que se trabajaba todos los días experimentales subsecuentes.

*Día 2:* Condicionamiento. Los animales que formaban los grupos condicionados eran expuestos al estímulo olfativo Chanel No. 5 aplicado sobre el vientre de una madre (ver sección 5.2.1). Los grupos controles eran expuestos a las madres de la misma manera que los condicionados pero *sin* el perfume. Siempre que fue posible ambos grupos, controles y condicionados, eran expuestos a la misma coneja, exponiendo a los animales controles a la madre antes de aplicarle el perfume.

*Día 3.* Prueba de evocación. Veinticuatro h después del condicionamiento los gazapos eran expuestos de nuevo al estímulo condicionante pero en ausencia de la madre y se evaluaba, mediante la observación y cuantificación de su conducta, si los animales eran capaces de reconocer el estímulo y reaccionar ante él como ante la madre, esto es, si los gazapos habían aprendido a asociar el olor del perfume con el evento de amamantamiento.

Terminados los experimentos, los animales eran colocados con sus madres en las cajas nido y criados normalmente.

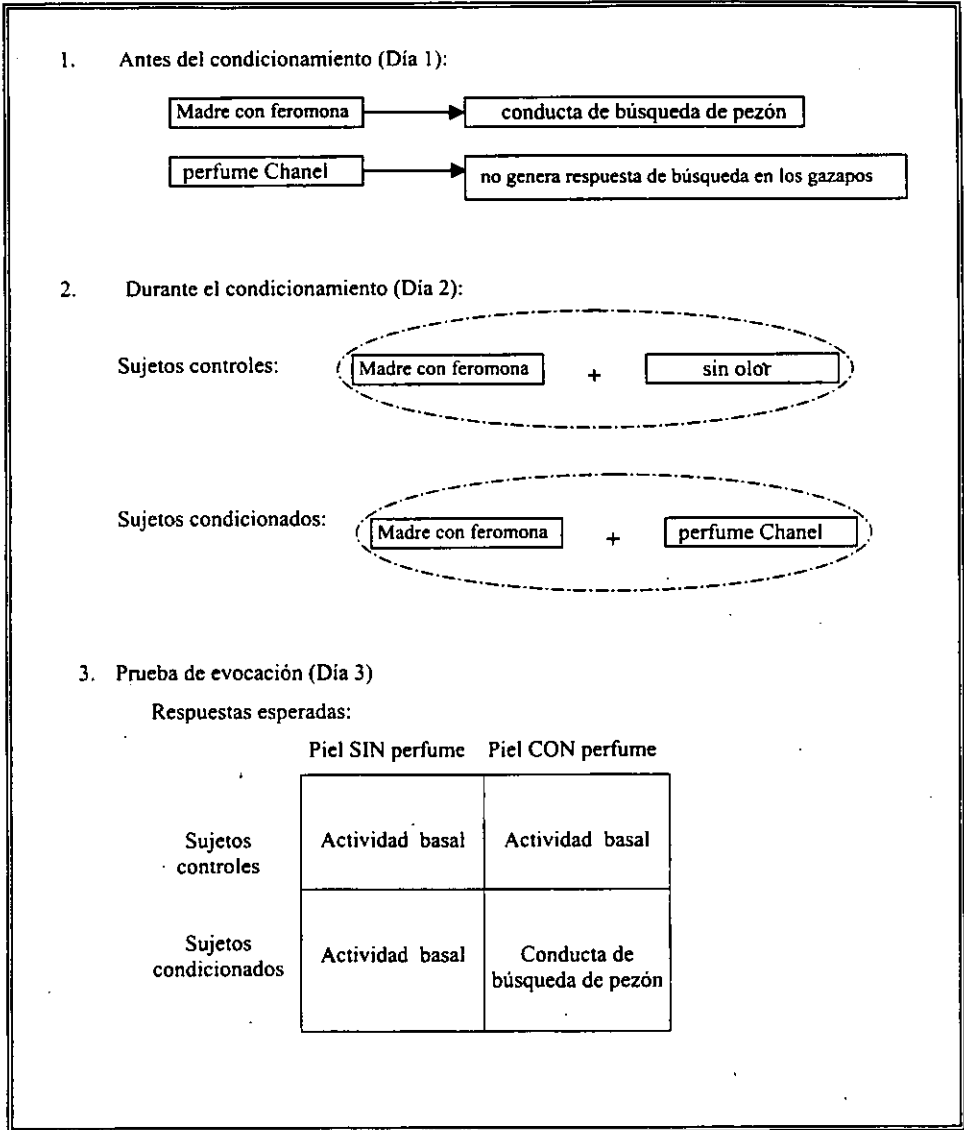


Fig. 3 Esquemización del diseño experimental.



### 5.2.1 Condicionamiento

Para llevar a cabo el condicionamiento, las conejas eran perfumadas con el estímulo condicionante, Chanel No. 5. El perfume se aplicaba sobre el vientre con un isopo de algodón, formando un gradiente descendiente comenzando alrededor de los pezones y disminuyendo hacia el resto del abdomen. Los pezones en sí se dejaban sin perfumar para evitar que el sabor del perfume alterara la adhesión de los gazapos a ellos. Los gazapos fueron presentados con el perfume aplicado sobre el vientre de las madres en cinco diferentes condiciones que conformaron los diferentes experimentos descritos a continuación. Tras el condicionamiento los gazapos eran retirados y mantenidos en laboratorio hasta la prueba de evocación 24 h después. Las madres que fueron anestesiadas (ver Experimentos 2 al 5) permanecían bajo observación hasta que salían de la anestesia y luego eran colocadas en sus jaulas.

La Tabla 1 al final de la sección resume las condiciones experimentales durante los diferentes experimentos. El condicionamiento según las cinco condiciones experimentales ( $n = 16/\text{grupo}$ ) se llevó a cabo de la siguiente manera:

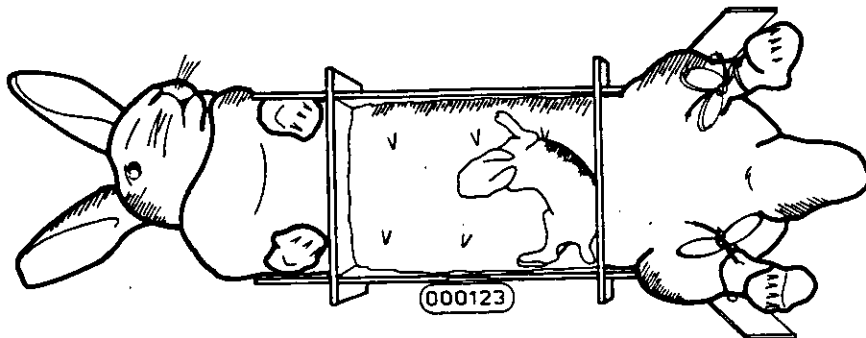
*Experimento 1: Durante el amamantamiento natural (NAT).* Este experimento se llevó a cabo según Hudson (1985). Consideramos a las condiciones de condicionamiento como naturales ya que las madres se encontraban despiertas y alimentaban activamente a los gazapos dentro de la caja nido. Se generó un grupo condicionado (NAT) y uno control (cNAT). Para generar el grupo condicionado las conejas eran perfumadas como se describe en el párrafo anterior y se les dejaba acostumbrarse al perfume durante alrededor de 10 min. Una vez pasado este lapso de habituación los gazapos llevados al bioterio en camadas mixtas no mayores de seis sujetos, y colocados en las cajas nido a la hora establecida en el día 1. La caja nido se introducía dentro de la jaula maternal (Fig. 2). Las madres en general no tardaban más de 1 min en entrar a las cajas y nunca se les forzó a hacerlo. El tiempo de amamantamiento fue de aproximadamente 3 min y de no más de 5 min. Pasados estos minutos las madres salían libremente de las cajas y los gazapos eran retirados y conservados en el laboratorio hasta el día siguiente como se describe arriba.

Los animales que conformaron el grupo control fueron tratados de la misma manera pero se les colocó con una madre sin perfumar, tiempo antes de perfumar a la madre del otro grupo para evitar la contaminación del bioterio con el olor del perfume.

*Experimento 2: Sobre una madre anestesiada (ANE).* Se generaron también un grupo condicionado (ANE) y un grupo control (cANE). A diferencia del condicionamiento natural, las madres eran anestesiadas y los gazapos eran colocados de uno en uno sobre sus vientres para que se amamantasen. La anestesia intramuscular se aplicaba en una dosis de 0.5 ml/kg de una mezcla 1:1 de ketamina

(Cheminova) y rompun (Bayer). Una vez dormidas, a las conejas se les aplicaban 5 U.I. de oxitocina (Syntocinon) intramuscular para estimular la eyección de leche de las glándulas mamarias. Para el condicionamiento las hembras anestesiadas eran colocadas bocarriba en una tina de acrílico en forma de U sobre un armazón de metal con el cual se sujetaban las patas, y el área de los pezones se delimitó con una arena de acrílico de 18 x 13 x 13 (altura) cm (Fig. 3). Se procuraba que la superficie ventral de la hembra quedara lo más horizontal y plana posible para que los gazapos pudieran moverse con facilidad sobre ella.

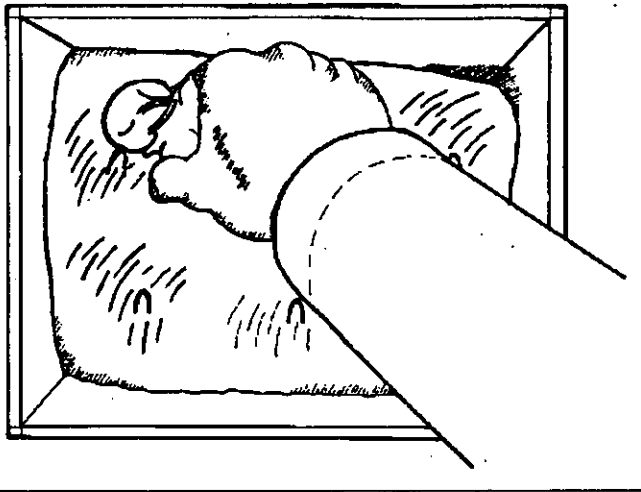
Una vez sujetas, las conejas eran perfumadas como se describió con antelación y antes de colocar a los gazapos sobre la madre se permitía que pasaran 5 min para que la oxitocina tuviera su efecto sobre las mamas y para que el olor y concentración del perfume se estabilizaran. Pasado este lapso, los gazapos eran colocados de uno en uno sobre el vientre de la madre donde se les dejaba moverse libremente hasta que se adherían a un pezón. Una vez adheridos al primer pezón, se les permitía un total de 10 adhesiones de no más de 10 s, lo que equivale en promedio a un total de 100 s de adhesión (y por lo tanto ingesta de leche) por gazapo. Este tiempo de ingesta y adhesión corresponde al que reportan Hudson y Distel (1983) para los gazapos en condiciones de observación más naturales que corresponderían a las del Experimento 1. Para controlar el tiempo de adhesión los sujetos eran removidos manualmente de los pezones y luego se les soltaba para que pudieran llevar a cabo la conducta de búsqueda hasta encontrar el siguiente pezón. La sesión de condicionamiento duraba en total aproximadamente 180 s para cada gazapo.



**Fig. 4** Coneja anestesiada sujeta bocarriba en una tina de acrílico en forma de U y sujeta de las patas a una estructura metálica diseñada con este propósito. El área ventral se delimitaba mediante dos placas acrílicas deslizables y paralelas que se colocaban una a la altura del pecho y otra a la altura de las ingles. De la pared de acrílico cuelga un reloj segundero mediante el cual se registró el tiempo tanto durante las sesiones de condicionamiento como durante las pruebas de evocación. Los gazapos eran colocados sobre el vientre de la madre durante el condicionamiento. Este montaje experimental se empleó para todos los experimentos excepto NAT y cNAT.

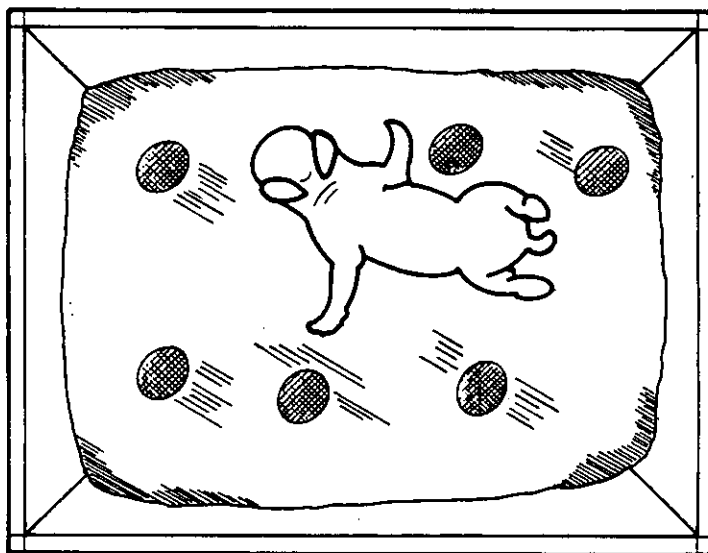
*Experimento 3: Sobre una madre anestesiada, sin leche (SL).* El tratamiento de los gazapos y de las conejas fue igual al que se describe para el Experimento 2. La diferencia radicó en que las madres empleadas para el condicionamiento amamantaban a otra camada antes de ser anestesiadas de tal forma que ya no tuvieran leche en las mamas durante el condicionamiento y, para asegurar la ausencia de leche, no se les aplicaba la oxitocina en ningún momento. Para este experimento también se generó un grupo condicionado (SL) y uno control (cSL).

*Experimento 4: Sobre una madre anestesiada, solo con adhesión a los pezones (ADH).* Aquí se pretendió reducir los estímulos maternos para dejar únicamente la estimulación proporcionada por la adhesión a los pezones y la presencia de la feromona materna. Para ello, las hembras y los gazapos fueron tratados como se describe en el Experimento 3, SL. Las madres sin leche fueron anestesiadas y perfumadas y no se les aplicó oxitocina. Los gazapos que conformaron este grupo condicionado (ADH) eran sujetos manualmente sobre los pezones a los cuales se adherían sin dificultad. Como para los dos experimentos anteriores, se les permitieron 10 adhesiones de no más de 10 s pero todo el cuerpo de los sujetos permanecía inmovilizado (Fig. 5). No se les permitió en ningún momento ejercer la conducta de búsqueda ni contactar con la madre a través de otra parte de su cuerpo que no fuera el hocico.



**Fig. 5** Acercamiento al área ventral de una coneja sujeta como se muestra en la Fig. 4. Una mano sostiene a un gazapo directamente sobre un pezón, manteniéndolo inmóvil pero permitiéndole adherirse libremente a los pezones.

*Experimento 5: Sobre una madre anestesiada, solo con búsqueda (BUS).* Se pretendió retirar la leche y la estimulación proporcionada por la adhesión a los pezones, dejando únicamente la conducta de búsqueda y la presencia de la feromona. Las madres eran anestesiadas, perfumadas y sujetas como se describe para los Experimentos 2, 3 y 4 pero se les rasuraba el pelo adyacente a los pezones y cada pezón era cubierto mediante una banda adhesiva circular para impedir que los gazapos se pudieran adherir a ellos (Fig. 6). Los gazapos que conformaron este grupo (BUS) eran colocados sobre el vientre de la madre perfumada donde permanecían un total de 100 s moviéndose libremente pero sin poder adherirse a los pezones.



**Fig. 6** Acercamiento al vientre de una madre sujeta como en las figuras anteriores pero cuyos pezones estaban cubiertos con cinta adhesiva, formando una especie de "multikini". El gazapo se desplaza con libertad pero no puede adherirse en ningún momento a un pezón.

Mediante los procesos descritos, en todos los experimentos los sujetos condicionados eran expuestos simultáneamente al olor novedoso - el perfume - y a la feromona que normalmente estimula a los gazapos a manifestar la conducta de búsqueda de pezón (Hudson y Distel 1983, 1995).

Tabla 1. Condiciones experimentales durante los diferentes tipos de condicionamientos

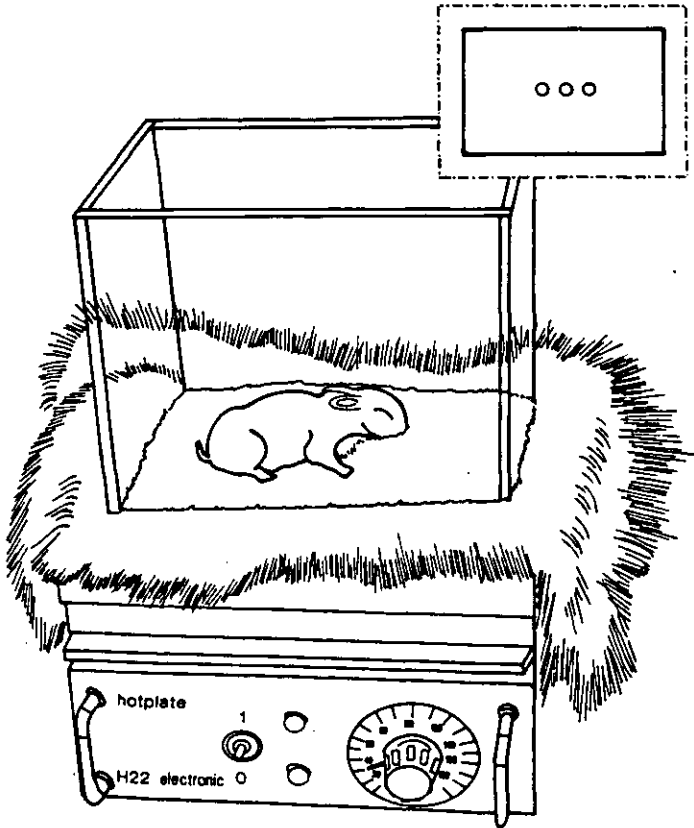
Grupo Experimental n = 16/ grupo	Estado de la madre	Tiempo de exposición a la madre	Perfume	Feromona	Léche	Adhesiones	Búsqueda
Natural (NAT)	despierta	≈ 180 s	SI	SI	SI	Sí, libres	libre
Madre Anestesiada (ANE)	anestesiada	≈ 180 s	SI	SI	SI	10 de 10 s	libre
Sin Leche (SL)	anestesiada	≈ 180 s	SI	SI	NO	10 de 10 s	libre
Adhesión (ADH)	anestesiada	≈ 100 s	SI	SI	NO	10 de 10 s	NO
Búsqueda (BUS)	anestesiada	100 s	SI	SI	NO	NO	libre
Control Natural (cNAT)	despierta	≈ 180 seg	NO	SI	SI	Sí, libres	libre
Control Madre Anestesiada (cANE)	anestesiada	≈ 180 seg	NO	SI	SI	10 de 10 s	libre
Control Sin Leche (cSL)	anestesiada	≈ 180 seg	NO	SI	NO	10 de 10 s	libre

### 5.2.2 Prueba de evocación

Esta prueba se elaboró según Kindermann y colaboradores (1991, 1994). Veinticuatro horas después del condicionamiento, antes de la hora de amamantarse, los gazapos eran sujetos a la prueba de evocación. Esta consistía en que a cada animal se le presentaban dos distintas condiciones en ausencia de la madre; una sin el estímulo condicionante (perfume Chanel No. 5) y otra donde éste estuviera presente. La presentación del estímulo se llevó a cabo de la siguiente manera:

En una placa térmica (Corning, PC-620) se colocaba una piel curtida de conejo y se mantenía a 30°C (Fig. 7). El área de prueba (234 cm<sup>2</sup>) se delimitaba con una arena de acrílico con las mismas medidas que aquella empleada durante el condicionamiento para delimitar el vientre de las conejas (18 x 13 x 13 (altura) cm; Fig. 4) y de la cual colgaba un reloj segundero con el que se registraba el tiempo. En el centro

del área de prueba se definían tres puntos equidistantes entre sí (Fig. 7, inserción). En estos tres puntos se mojaba la piel con agua para la condición control o se perfumaba la piel con el estímulo Chanel No. 5 para la condición experimental.



**Fig. 7** Arena de prueba: una piel de conejo colocada sobre una placa caliente y delimitada mediante una arena de acrílico. En esta área se observa a un gazapo durante una prueba de evocación. En el extremo superior derecho se puede ver la vista superior de la arena y están indicados los tres puntos en donde se aplicaba el agua o el perfume antes de cada prueba, según la condición, control o perfume (para las medidas empleadas para trazar los puntos ver Anexo).

Cada animal era colocado primero sobre la piel sin perfume y luego sobre la piel perfumada y en cada condición se le dejaba moverse libremente durante 180 s. Al comenzar la prueba sobre cada una de

las diferentes pieles, cada gazapo era colocado de tal forma que su hocico quedase en el centro de la arena, alineado con el eje longitudinal de la arena. Como se probaban varios gazapos en una sola ocasión, se alternaba la dirección del hocico de uno respecto al anterior hacia uno u otro lado de la arena. El orden de las pruebas (primero sobre la piel control y luego sobre la piel con perfume) tenía dos funciones: la primera era para evitar cualquier tipo de contaminación de la piel control con el perfume. La segunda era el minimizar posibles resultados positivos falsos por parte de los gazapos, esto es, evitar el atribuirles una reacción de reconocimiento al perfume cuando podría tratarse básicamente de un fenómeno de excitación ante la primera exposición a la piel.

Para controlar la posible variación en la calidad y la concentración del estímulo, cada dos sujetos la piel era mojada o reperfumada, según el caso. Además, los animales sin condicionar y los animales condicionados eran intercalados entre sí a lo largo de la prueba para controlar también por las diferencias en el horario entre grupos. Para cada una de las condiciones se emplearon una piel y una arena diferente. El tiempo se registraba mediante un segundero que colgaba de la arena. Todas las sesiones se videograbanaban para su posterior análisis.

### 5.2.3 Videograbación

Todas las sesiones de condicionamiento (excepto la del condicionamiento en el nido del Experimento 1) y todas las pruebas de evocación eran filmadas con una cámara de vídeo Panasonic M9000 en formato VHS. La cámara estaba fija en un trípode justamente por encima de la madre anestesiada o de la arena de la prueba de evocación. El cuadro de la cámara abarcaba únicamente la arena de acrílico que delimitaba al vientre de la madre o al área de prueba y el reloj que colgaba de ella. Para cada gazapo se elaboró una tarjeta identificadora con su color y en la cual se describía la fecha, experimento y condición a la cual estaba siendo sujeto el animal, así como la madre sobre la cual se estaba condicionando cuando era el caso (ver Anexo).

## 5.3 Análisis de la conducta

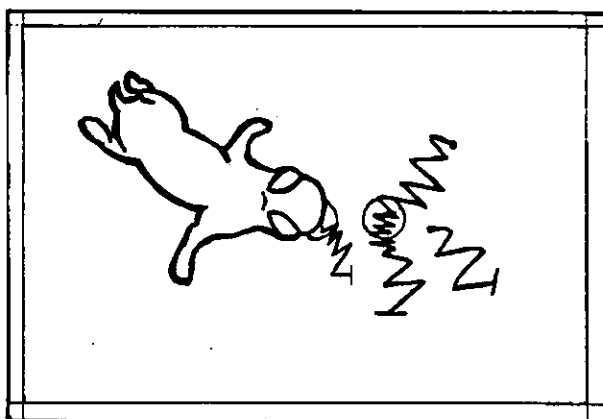
### 5.3.1 Parámetros conductuales

La conducta de los gazapos sobre el vientre materno durante la succión ha sido descrita previamente por Hudson y Distel (1983). En general, se compone de varios factores entre los cuales destacan la búsqueda y la consecuente adhesión al pezón, la rasquiña y el desplazamiento sin búsqueda (ver descripciones del repertorio conductual adelante). Sin embargo, dentro de la prueba de evocación se reducen las posibilidades de acción de los gazapos por la ausencia de los pezones.

La evaluación de la conducta de los gazapos sobre la piel durante la prueba de evocación estuvo dada por varios parámetros, unos según Hudson y Distel (1983) y Kindermann et al (1991, 1994) y otros que fueron nuevas aproximaciones al paradigma ya establecido. Se evaluaron en total siete diferentes parámetros para describir la conducta de los sujetos y para diferenciar entre los distintos grupos y sus distintos tratamientos.

Los parámetros conductuales evaluados como se describe en la literatura citada fueron:

*Tiempo total de búsqueda (TTB).* La conducta de búsqueda describe un movimiento rápido del hocico hacia arriba y abajo que se desplaza en forma de zig-zag como está descrito por Hudson y Distel (1983) y Hudson (1985; Fig. 8). Este movimiento va acompañado generalmente por la colocación de las patas delanteras separadas hacia el frente en una posición tensa, quieta y equidistante que permite el libre movimiento de la cabeza. Un evento de búsqueda se registraba cuando los gazapos llevaban a cabo esta conducta por un tiempo mayor a 1 s y terminaba cuando los animales paraban la conducta por más de 1 s, generalmente en el momento en que levantaban el hocico de la piel o al quedarse inmóviles, rascar o desplazarse. En una hoja de registro (ver Anexo) se indicaba el lapso temporal en el cual transcurría cada evento de búsqueda a lo largo del tiempo de prueba (180 s) y al final se sumaba el tiempo total de ésta para cada gazapo. También se registró el número total de gazapos de cada grupo que presentaron búsquedas en las diferentes pruebas, con y sin perfume.



**Fig. 8** Vista superior del área de prueba con un gazapo condicionado sobre una piel perfumada. La línea en zig-zag describe la conducta de búsqueda, el desplazamiento del hocico del gazapo sobre el área del perfume. Los puntos indican el comienzo de cada evento de búsqueda y las rayas el fin. Los círculos al centro del dibujo indican los puntos de aplicación del perfume.



*Frecuencia de eventos de búsqueda (F de B).* La frecuencia de búsqueda se refiere al número total de eventos de búsqueda, con una duración mínima de 1 s, que sucedían a lo largo del tiempo de prueba (180 s). Para cada sujeto se contaba el número total de eventos de búsqueda a lo largo de los 180 s y se registraba también si estas búsquedas habían comenzado dentro o fuera del área de estímulo (Fig. 9).

*Distribución de los eventos de búsqueda a lo largo del tiempo (B en T).* Este análisis se modificó a partir del trabajo de Kindermann y colaboradores (1991). El análisis de la distribución de eventos de búsqueda en el tiempo se hizo mediante la división del tiempo total en lapsos de 20 s, reportando el número total de búsquedas iniciadas por todos los sujetos de un grupo en cada ventana temporal.

Como parámetros nuevos se evaluaron:

*Tiempo de permanencia dentro o fuera del área del estímulo (T df).* El área de estímulo se tomó como un área elíptica que quedaba justamente en medio de la arena de prueba y que abarcaba 1/5 del su área total (Fig. 9). Para determinar si el animal se encontraba dentro o fuera de ésta se tomó como referencia el hocico del mismo y era éste el que daba la pauta según su ubicación e independientemente de donde estuviera el resto del cuerpo. Cada vez que un animal desplazaba el hocico dentro del área de prueba por más de 1 s se comenzaba a registrar el tiempo de permanencia en ella. Cuando los animales sacaban el hocico por más de 1 s se terminaba el registro y no se registraba otra vez hasta que de nuevo el hocico del gazapo permaneciera por más de 1 s dentro del área delimitada como de estímulo. Bajo este criterio, los animales llevaron a cabo muchas intromisiones de 1 solo s de duración. Los intervalos de tiempo de permanencia dentro del área se anotaban en las hojas de registro (Anexo) y al final, se sumaba el tiempo total de permanencia dentro del área. El tiempo de permanencia fuera del área se calculaba mediante una resta (180 s menos el tiempo de permanencia dentro del área).

*Tiempo relativo de búsqueda dentro y fuera del área de estímulo (B df).* Para este parámetro se tomó el tiempo total de búsqueda relativo al tiempo total de permanencia en cada área (dentro o fuera), esto es, primero se obtuvo el tiempo de permanencia en cada una de las áreas y, tomando este tiempo como el total, se calculó cuanto de ese tiempo los animales presentaron la conducta de búsqueda.

*Actividad general (AG).* La evaluación de la actividad general de los gazapos se empleó como una medida para evaluar la conducta motora y el estado motivacional de los animales. Para tal efecto se dividió el desempeño conductual de cada gazapo sobre la piel en cuatro conductas excluyentes entre sí (Fig. 9).



### 5.3.2 Otras medidas

*Peso al nacer.* Se registró el peso de cada animal el día de su nacimiento (día 0).

*Ingesta total de leche.* Para los grupos NAT y ANE y sus respectivos controles se calculó la cantidad de leche ingerida por gazapo durante el condicionamiento mediante la evaluación de la diferencia en su peso antes y después del evento.

*Tiempo en contacto con la madre durante el condicionamiento.* El número de adhesiones y su duración estaban acotadas experimentalmente para cada gazapo pero, debido a que los gazapos normalmente presentan diferencias individuales en el tiempo que tardan en iniciar las búsquedas, encontrar los pezones, adherirse a ellos y, una vez desprendidos, volver a encontrar otro pezón etc, se creyó pertinente registrar el tiempo total que los sujetos de los distintos grupos pasaban en contacto con el vientre materno. Además esta medida también se llevó a cabo para evaluar cuanto del tiempo de condicionamiento correspondía a la pura manipulación de los gazapos por parte de los experimentadores.

*Tiempo total de adhesión.* Para los grupos ANE, SL y ADH y sus controles se cuantificó el tiempo total que cada gazapo permaneció adherido a los diferentes pezones durante el condicionamiento. A cada gazapo se le permitía adherirse diez veces en total (ver 5.2.1) un máximo de 10 s pero, el tiempo de adhesión varió entre los sujetos. Se calculó el promedio de tiempo de adhesión para cada gazapo y para cada grupo.

### 5.3.3 Análisis estadístico

Los datos registrados se dividieron para su análisis en dos partes. La primera parte consta de una descripción de la actividad de los gazapos durante el condicionamiento. La segunda parte describe la actividad de los gazapos durante la prueba de evocación con un énfasis mayor sobre la descripción de la conducta de búsqueda.

Para evaluar la ingesta de leche para los grupos NAT, cNAT, ANE y cANE y el tiempo de adhesión a los pezones para los grupos ANE, cANE, SL, cSL y ADH se emplearon análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Para el análisis *post hoc* se usó la prueba de Neuman-Keuls.

El resto de las medidas pertinentes a la búsqueda, rasquiña, desplazamiento e inmovilidad requirieron de un análisis no paramétrico debido a que no presentaron una distribución normal y la varianza de los datos era demasiado grande. Para comparar los datos de todos los diferentes grupos durante la prueba de evocación en las pieles con y sin perfume se empleó la prueba de Kruskal-Wallis de análisis de varianza de una sola vía. Este análisis se generaba para comparar a los grupos condicionados

entre sí mismos y luego por separado a los grupos controles entre sí. Tras el análisis de varianza, las pruebas *post hoc* empleadas para hacer el análisis pareado entre grupos fueron la prueba de *U* de Mann-Whitney para grupos independientes y la prueba de Wilcoxon para los datos generados por los mismos sujetos en la pieles con y sin perfume.

Por último, para evaluar las posibles relaciones entre a) el peso al nacer, conocido como un parámetro útil para predecir el desempeño de los gazapos durante el amamantamiento (Drummond et al 2000) y el tiempo total de búsqueda durante la prueba de evocación y b) la ingestión de leche, conocida como reforzador en varios paradigmas experimentales (Johanson y Hall 1979, Johanson et al 1984, Sullivan y Hall 1988) y el tiempo total de búsqueda durante la prueba de evocación se obtuvieron los coeficientes de correlación por rangos de Spearman.

La estadística se calculó mediante el programa SPSS v.8 y las gráficas se elaboraron utilizando el programa SigmaPlot v.3. y SigmaPlot 2000.

## 6. Resultados

### 6.1 Condicionamiento

Todos los sujetos reaccionaron normalmente ante las madres durante el condicionamiento, estuvieran perfumadas o no. Todos los sujetos colocados sobre las madres anestesiadas presentaron un repertorio conductual aparentemente normal, ejerciendo principalmente la conducta de búsqueda de pezón, acompañada de breves pausas, del ejercicio de rasquiña y de la adhesión y succión de los pezones. Esto sucedió a pesar de que las conejas se encontraban inmóviles y colocadas bocarriba, en dirección inversa a la que están normalmente. Algunos de los gazapos expuestos a las madres recién perfumadas presentaron cierta latencia en comenzar a ejercer la conducta de búsqueda pero una vez iniciada, la ejercían igual que los sujetos expuestos a madres sin perfumar. Esta latencia no se cuantificó debido a que fue muy esporádica.

*Ingesta de leche y tiempo de adhesión a los pezones.* Para NAT y cNAT no hubo registro filmico de la conducta durante el amamantamiento y por ello no se pudo generar un análisis conductual de este evento. Alternativamente la ingestión de leche por gazapo fue el principal parámetro con base en el cual se evaluó el desempeño de cada sujeto. Todos los gazapos bebieron leche durante el condicionamiento. El promedio de ingestión para NAT y cNAT fue de 12.7 g (DE 3.8) y 9.6 g (DE 5.1) respectivamente. Los únicos otros grupos que tuvieron acceso a la leche fueron ANE y cANE y el promedio de ingestión de leche para estos grupos fue de 9.8 g (DE 4.3) y 11.7 g (DE 5.0) respectivamente.

La respuesta de los sujetos ANE y cANE a la madre anestesiada, sujeta bocarriba e inyectada con oxitocina fue vigorosa y eficaz. La gran mayoría de los sujetos comenzaron a buscar los pezones inmediatamente después de entrar en contacto con el vientre de la coneja anestesiada. Todos lograron localizar los pezones, adherirse a ellos e ingerir leche.

Un ANOVA de una sola vía demostró que no hubo diferencias significativas en el consumo de leche entre los cuatro grupos ( $F(3,60) = 1.79, p = 0.16$ ). Casi todos los sujetos permanecieron adheridos a los pezones los 10 s que duraba cada una de las 10 adhesiones permitidas. El promedio de tiempo de adhesión a los pezones calculado para ANE y cANE fue de 94.8 s (DE 10.3) y 98.7 s (DE 4.9). Cabe mencionar que estos promedios se obtuvieron a partir de  $n = 10$  y  $n = 9$ /grupo respectivamente, debido a un error en la filmación de estos sujetos, los primeros de todo este trabajo, que no permitió cuantificar las adhesiones del resto de los sujetos de cada grupo (en total hay  $n = 16$ /grupo).

Los grupos SL, cSL, a pesar de la ausencia de leche, presentaron una conducta muy semejante a la de los sujetos ANE y cANE, respondiendo a la madre con la conducta de búsqueda y adhiriéndose a los pezones. Sin embargo, muchos de estos sujetos no permanecieron los 10 s establecidos adheridos a los

pezones. El promedio del tiempo de adhesión para SL y cSL fue de 79.6 s (DE 17.9) y 80.6 s (DE 12.3) respectivamente.

Los sujetos del grupo ADH que también tuvieron acceso a los pezones pero sin búsqueda, se adhirieron sin problema en cuanto eran expuestos a ellos. A pesar de la ausencia de leche, estos sujetos presentaron un tiempo de adhesión promedio de 91.5 (DE 11.9). Un ANOVA de una sola vía expresó una diferencia significativa en tiempo de adhesión entre ANE, SL y ADH ( $F(2,45) = 5.79, p = 0.006$ ). Una prueba post hoc de Neuman-Keuls indicó que los sujetos SL presentaron un tiempo de adhesión significativamente menor al de los sujetos ANE ( $p = 0.005$ ) y ADH ( $p = 0.03$ ), pero que no hubo diferencia significativa entre ANE y ADH ( $p = 0.49$ ).

Los sujetos BUS podían desplazarse libremente sobre el vientre de las madres y así lo hicieron, buscando vigorosamente en general a lo largo de los 100 s que duraba el condicionamiento. Estos gazapos lograron localizar los pezones a pesar de que se encontraban cubiertos con cinta adhesiva, ya que presentaron una búsqueda intensiva a su alrededor, aparentemente intentando adherirse a ellos.

*Tiempo total en contacto con la madre.* A pesar de que el condicionamiento estaba controlado en términos del número de adhesiones permitidas y la duración de las mismas para cada gazapo, el tiempo total que cada uno de ellos permaneció sobre el vientre de la madre anestesiada hasta completar las 10 adhesiones variaba: a) en dependencia del tiempo que le tomaba a cada animal comenzar a buscar y encontrar los pezones que fue el caso de los grupos ANE, SL, cANE y cSL quienes podían moverse libremente en busca de los pezones, o b) como consecuencia de la manipulación intrínseca al protocolo experimental como fue el caso de ADH para los cuales el tiempo en contacto con la madre se registró desde que el gazapo era expuesto al primer pezón y hasta que terminaban las 10 adhesiones, incluyendo en este registro el tiempo que le tomaba al experimentador sujetarlo a un pezón, removerlo, sujetarlo al siguiente y así sucesivamente hasta terminar el condicionamiento. Un ANOVA de una sola vía (Kruskal-Wallis) indicó que hubo diferencias significativas entre los grupos ( $H = 14.57, p = 0.006$ ) que estuvieron dadas por un mayor tiempo de exposición a la madre de ANE respecto a ADH y a cSL ( $U = 19, p = 0.001$  y  $U = 24, p = 0.003$  respectivamente).

## 6.2 Prueba de evocación

Para el análisis estadístico se emplearon todos los sujetos controles (cNAT, cANE, cSL,  $n = 48$ ) para hacer las comparaciones con ADH y BUS, los dos grupos que no contaron con sus propios controles.

A continuación se presenta un análisis extensivo de los datos analizados para todos los grupos. En la primera parte se muestra un análisis en donde se representa a cada uno de los gazapos de uno de los grupos (ANE) y su respectivo grupo control (cANE, 6.2.1). Posteriormente, mediante diagramas de caja con bigotes, se grafican los resultados de las medianas, cuartiles y rangos correspondientes a todos los grupos (*condicionados*: NAT: natural, ANE: anestesia, SL: sin leche, ADH: adhesión, BUS: búsqueda; *no condicionados*: cNAT: control natural, cANE: control anestesia, cSL: control sin leche) para los distintos parámetros conductuales analizados (6.2.2 - 6.2.4).

### 6.2.1 Conducta individual de los gazapos sobre las pieles sin y con perfume.

Todos los gazapos presentaron una actividad semejante, ejecutando el mismo repertorio conductual durante la prueba de evocación. La diferencia entre ellos radicó en los tiempos destinados a las distintas categorías: búsqueda, rasquiña, desplazamiento e inmovilidad. Para ejemplificar la distribución de la actividad de cada gazapo sobre las pieles sin y con perfume se tomó a los grupos ANE y cANE (Figs. 10 y 11) ya que estos corresponden a sujetos condicionados y no condicionados respectivamente, sobre una madre anestesiada tal como los sujetos de SL, ADH, BUS y cSL pero también se asemejan a NAT y cNAT en términos de que también ingirieron leche.

El Figura 10 muestra la conducta de cada uno de los sujetos condicionados ANE sobre las distintas pieles. Los sujetos buscaron significativamente más sobre la piel con perfume que sobre la piel sin perfume (Wilcoxon,  $p = 0.001$ ) y también se desplazaron más sobre la piel con perfume que sin él ( $p = 0.01$ ), permaneciendo significativamente más tiempo inmóviles sobre la piel sin perfume que sobre la piel perfumada ( $p = 0.01$ ).

La Figura 11 muestra la conducta de cada uno de los sujetos no condicionados cANE sobre las distintas pieles. Este grupo presentó significativamente más búsqueda sobre la piel sin perfume que sobre la piel perfumada (Wilcoxon,  $p = 0.009$ ) pero no fue diferente para rasquiña, desplazamiento ni inmovilidad en ausencia o presencia del perfume.

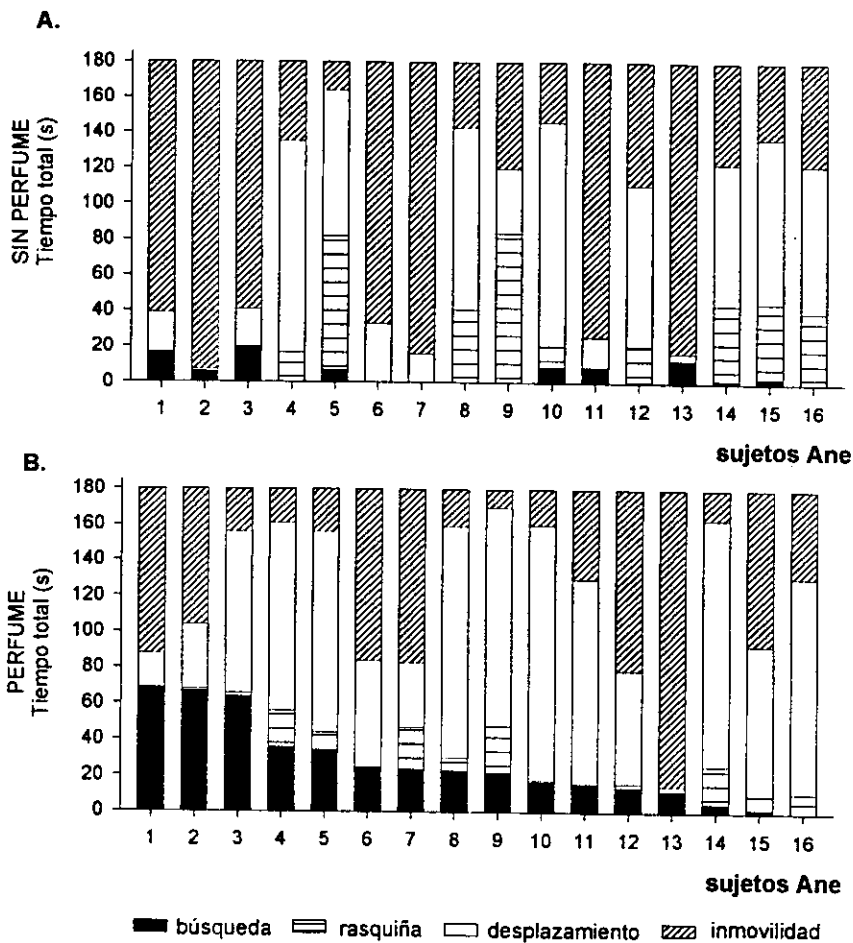


Fig. 10 Repertorio conductual individual durante la prueba de evocación de los gazapos condicionados sobre una madre anestesiada y con leche (ANE); A) piel sin perfume y B) piel con perfume. Cada barra apilada corresponde a un gazapo y se divide entre el tiempo destinado a cada una de las conductas que este ejerció durante la prueba de evocación (180 s/piel). Los sujetos fueron ordenados según su tiempo de búsqueda sobre la piel con perfume. Los números de cada barra corresponden al mismo individuo sobre las diferentes pieles.



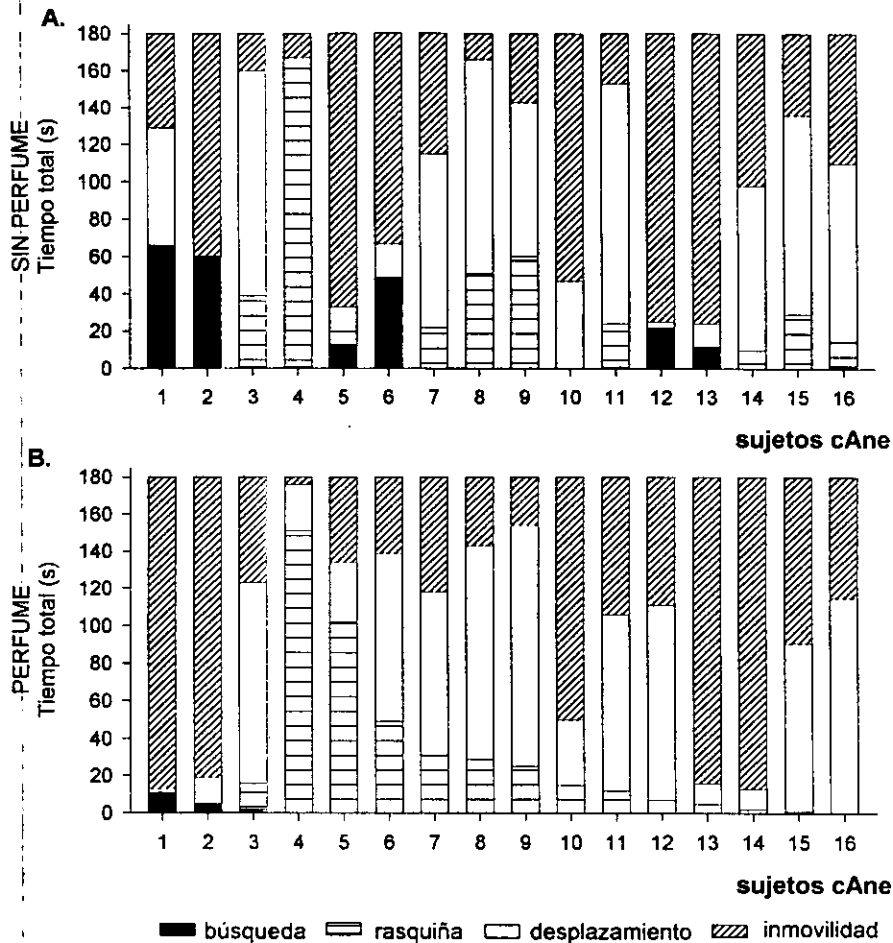


Fig. 11 Repertorio conductual individual durante la prueba de evocación de los gazapos no condicionados (controles) pero expuestos a una madre anestesiada y con leche (cANE): A) piel sin perfume y B) piel con perfume. Explicación como para Fig. 10.

## 6.2.2 Conducta de los grupos sobre las pieles sin y con perfume

*Sujetos condicionados.* Un análisis de varianza de Kruskal-Wallis expresó que entre los grupos condicionados (NAT, ANE, SL, ADH y BUS) había diferencias significativas en su desempeño sobre la piel sin perfume en tiempo de búsqueda (Fig. 11,  $H = 13.44, p = 0.009$ ) y rasquiña ( $H = 13.60, p = 0.009$ ) y sobre la piel con perfume para búsqueda (Fig. 11,  $H = 10.72, p = 0.03$ ) e inmovilidad ( $H = 10.84, p = 0.03$ ).

*Sujetos control.* Entre los grupos controles (cNAT, cANE y cSL) el mismo análisis encontró diferencias significativas únicamente en tiempos de desplazamiento ( $H = 12.7, p = 0.002$ ) e inmovilidad ( $H = 7.42, p = 0.024$ ) sobre la piel con perfume. El resto de los valores no revelaron ninguna diferencia significativa.

*Condicionados contra sus controles.* Sobre la piel sin perfume, NAT, ADH y BUS difirieron con sus controles presentando un mayor tiempo de rasquiña ( $U = 48, p = 0.003$ ;  $U = 139, p = 0.0001$ ;  $U = 176, p = 0.001$  respectivamente) y NAT y ADH presentaron un menor tiempo de inmovilidad que sus controles sobre esta piel ( $U = 48, p = 0.003$  y  $U = 59, p = 0.009$  respectivamente).

Sobre la piel con perfume, todos los grupos condicionados presentaron significativamente más búsqueda que sus controles (Fig. 12, NAT/cNAT:  $U = 31.5, p = 0.0001$ ; ANE/cANE:  $U = 14, p < 0.0001$ ; SL/cSL:  $U = 52, p = 0.002$ ; ADH/cTODOS:  $U = 93, p < 0.0001$ ; BUS/cTODOS:  $U = 199, p = 0.0005$ ). Los sujetos SL presentaron un mayor desplazamiento que sus controles ( $U = 47.5, p = 0.002$ ). Este grupo, junto con ANE también permaneció significativamente menos tiempo inmóvil que su control sobre esta piel ( $U = 44.5, p = 0.002$  y  $U = 256, p = 0.04$  respectivamente). No hubo diferencias entre condicionados y controles en términos de tiempo de rasquiña sobre la piel perfumada.

La Fig. 12 muestra el tiempo total de búsqueda para todos los grupos sobre ambas pieles mediante gráficas de caja y bigotes. Sobre la piel sin perfume NAT, ANE y SL buscaron significativamente más tiempo que los sujetos BUS ( $U = 68, p = 0.006$ ;  $U = 59, p = 0.002$ ;  $U = 89, p = 0.042$  respectivamente) y ANE más que ADH ( $U = 71, p = 0.016$ ). Las diferencias significativas sobre la piel con perfume entre los grupos condicionados se dieron entre NAT, ANE y ADH respecto a BUS ( $U = 69, p = 0.025$ ;  $U = 47, p = 0.002$ ;  $U = 68, p = 0.021$  respectivamente) ya que estos tres grupos presentaron la conducta de búsqueda por más tiempo que éste último. Las medianas del tiempo total de búsqueda sobre la piel perfumada para los sujetos condicionados fueron 14.5, 22.5, 9.5, 11.5 y 2.5 s respectivamente mientras que para los controles fue 0 s para todos. Los grupos controles no presentaron diferencias entre sí para este valor en ninguna piel.

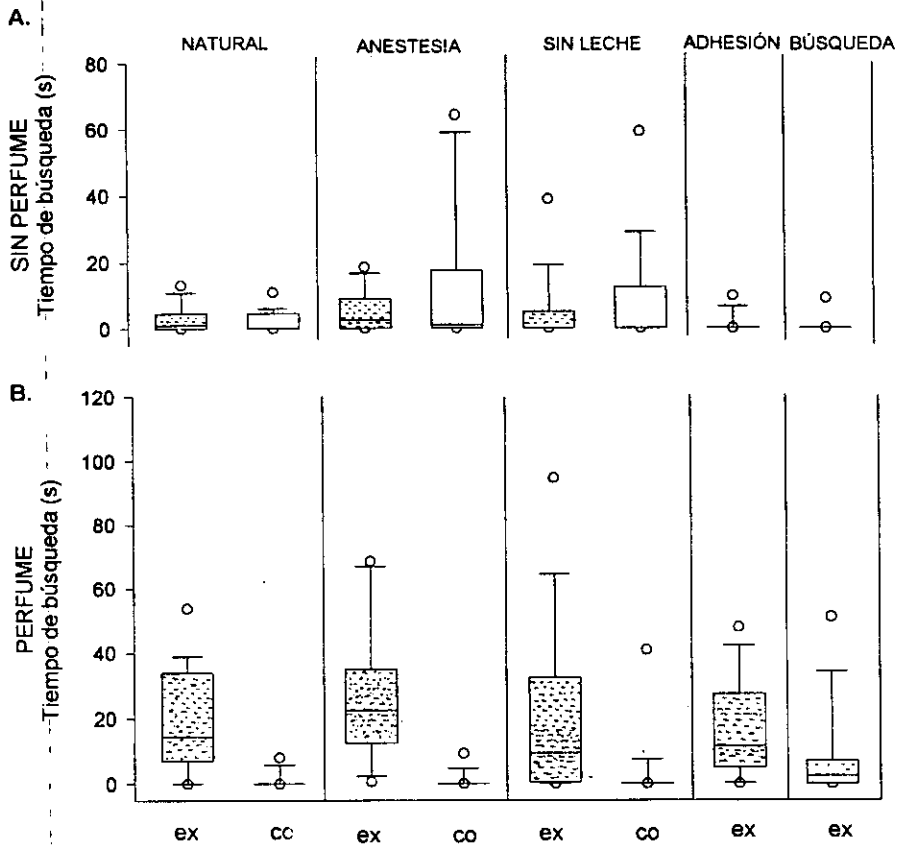


Fig. 12 Tiempo total de búsqueda de todos los grupos de estudio; diagrama de caja y bigotes: la caja muestra los cuartiles (25 y 75%) y las medianas (línea dividiendo la caja), los bigotes delimitan el rango de los datos y los círculos representan a los sujetos fuera de rango; A) piel sin perfume y B) piel con perfume. Las barras oscuras (ex) corresponden a los grupos condicionados y las barras blancas (co) a los grupos controles no condicionados.

El análisis del resto de las categorías conductuales (rasquiña, desplazamiento, inmovilidad), aunque mostró algunas posibles tendencias, no permitió distinguir claramente entre los grupos y por tanto no se ahondará más en esos resultados. Debido a que el tiempo de búsqueda fue la medida que mejor

permitió distinguir entre los tratamientos, las siguientes secciones pretenden dar una descripción más precisa de esta medida únicamente.

### 6.2.3 La conducta de búsqueda

*Número de sujetos buscando.* La primera diferencia en términos de la búsqueda radicó en el número total de sujetos por grupo que presentaron esta conducta durante la prueba de evocación sobre la piel con perfume. Sobre la piel sin perfume la respuesta de los gazapos fue muy variada mientras que, sobre la piel con perfume, los gazapos condicionados llevaron a cabo al menos tres veces más búsquedas que los controles (Tabla 2).

Tabla 2. Número total de sujetos buscando en cada grupo

Condición	Sin perfume	Con perfume
NAT	9	13
ANE	9	15
SL	6	12
ADH	3	14
BUS	1	11
cNAT	6	3
cANE	10	3
cSL	5	3

*Duración de los eventos de búsqueda.* Para esta medida no se obtuvo ninguna diferencia significativa entre los grupos condicionados ni entre los grupos controles sobre la piel sin perfume. Sobre la piel con perfume los grupos controles no fueron diferentes entre sí pero sí lo fueron los condicionados ( $H = 13.44, p = 0.009$ ). NAT, ANE y ADH difirieron con BUS cuyas búsquedas duraron en promedio menos tiempo ( $U = 21, p = 0.003$ ;  $U = 32, p = .009$ ;  $U = 30, p = 0.010$  respectivamente). Sin embargo no hubo diferencia entre los grupos condicionados y sus controles en ninguna de las pieles para esta medida, y por ello no se creyó que las diferencias entre los grupos condicionados fueran importantes.

*Distribución de los eventos de búsqueda a lo largo del tiempo.* El análisis de la distribución de los eventos de búsqueda a lo largo de la prueba de evocación se llevó a cabo como parte de las medidas que pretendían evaluar si entre los diferentes grupos había diferencias cualitativas en la manifestación de la conducta de búsqueda (aprendizaje) durante la prueba de evocación. El tiempo total de la prueba (180 s)

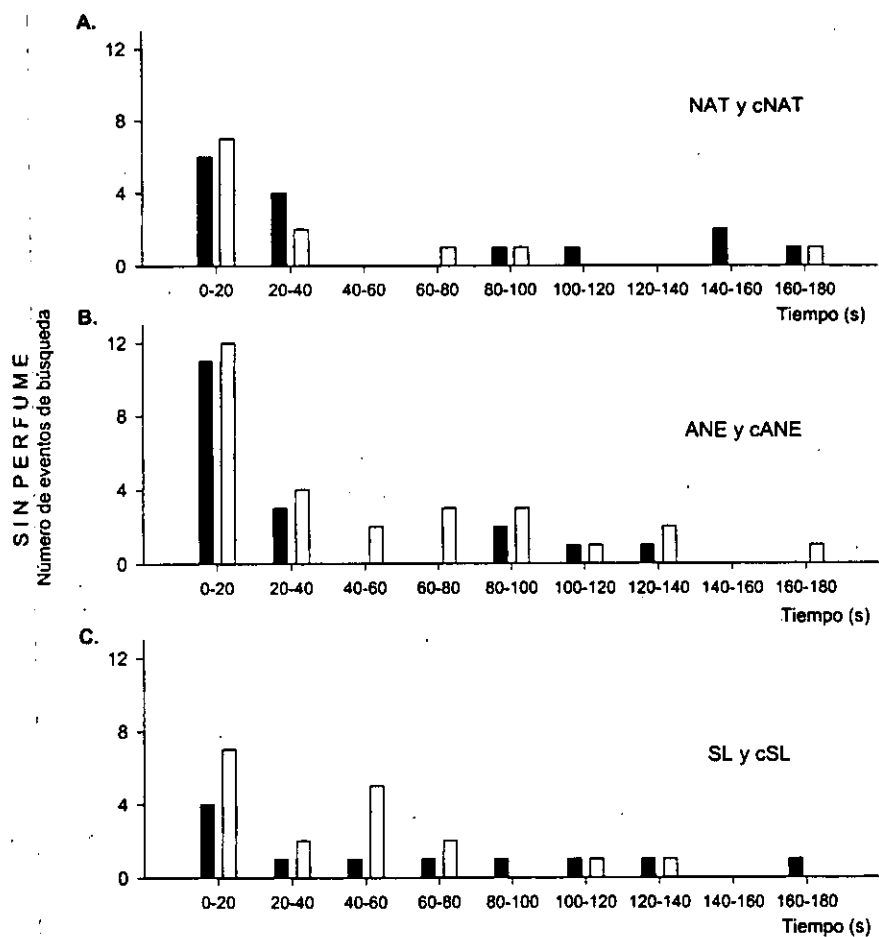
se dividió en ventanas de 20 s. En cada ventana temporal se agruparon los eventos de búsqueda presentados por cada grupo y su respectivo control sobre las distintas pieles.

La Figura 13 muestra la distribución de las búsquedas para los grupos NAT, ANE y SL sobre la piel sin perfume y la Figura 14 presenta los mismos datos para estos grupos pero sobre la piel perfumada. La Figura 15 presenta la distribución de las búsquedas de ADH y BUS sobre la piel sin perfume (arriba) y sobre la piel con perfume (abajo).

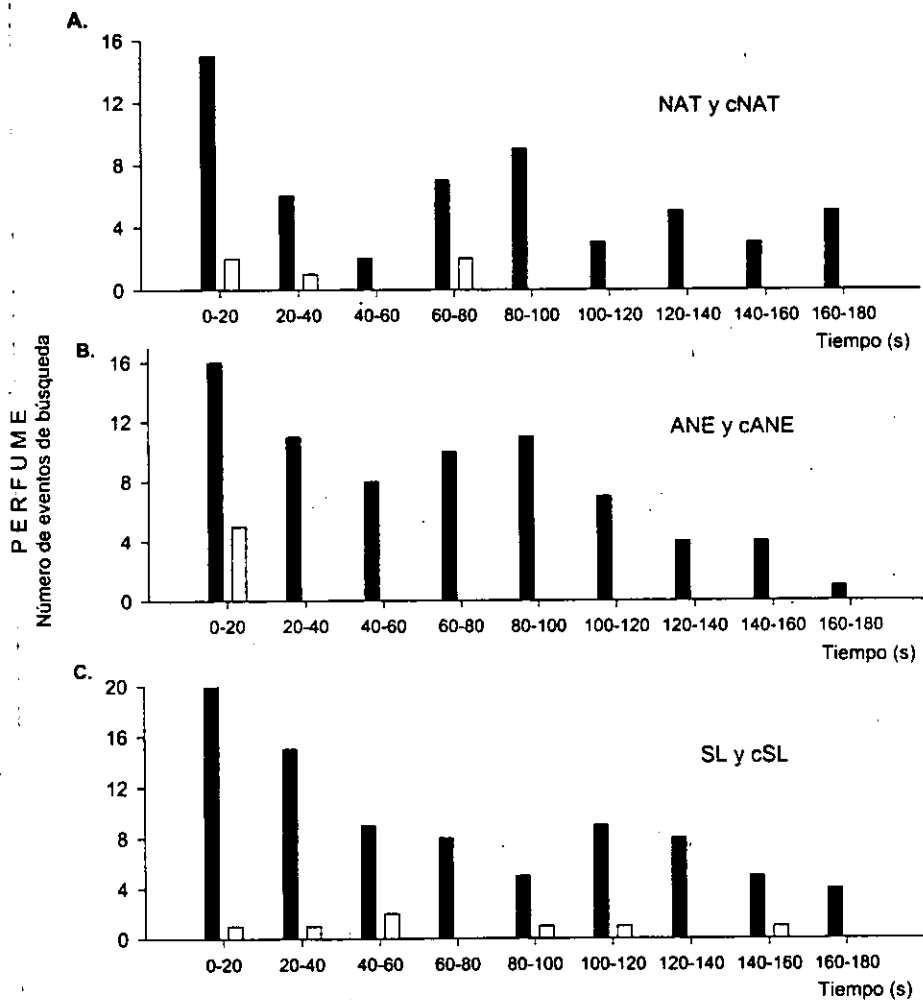
Sobre la piel sin perfume se observa un número similar de búsquedas entre controles y condicionados para todos los grupos en los primeros 20 s. Posteriormente solo se observan algunas búsquedas esporádicas durante el resto de la prueba, tanto para los controles como para los condicionados.

Sobre la piel con perfume los grupos condicionados mantienen las búsquedas durante todo el tiempo de prueba aunque los patrones de distribución varían ligeramente entre ellos (Figs. 14 y 15). El grupo BUS muestra una disminución en el número de búsquedas iniciadas en cada ventana temporal respecto a los demás grupos condicionados pero, sin embargo, también presenta búsquedas a lo largo de todo el tiempo de prueba. Sobre esta piel los sujetos controles presentan un menor número de búsquedas durante los primeros 20 segundos que sobre la piel control y el resto del tiempo de prueba solo presentan algunas cuantas búsquedas aleatorias.

*Correlación entre el peso al nacer y la ingesta de leche y la búsqueda.* Este análisis se llevó a cabo ya que se conoce que a) el peso al nacer es una medida útil para predecir el desempeño de los gazapos durante el amamantamiento (Drummond et al 2000) y b) con el fin de esclarecer el papel de la leche durante el condicionamiento previamente a probar la eficacia los experimentos en donde se condicionó a los gazapos sin leche. No hubo ninguna correlación entre el peso individual que los gazapos condicionados de los distintos grupos presentaron al nacer y la cantidad de búsqueda que ejercieron sobre la piel con perfume (Spearman, NAT  $r_s = -0.29$ ,  $p = 0.25$ ; ANE  $r_s = 0.06$ ,  $p = 0.8$ ; SL  $r_s = -0.37$ ,  $p = 0.15$ ; ADH  $r_s = -0.18$ ,  $p = 0.49$ ; BUS  $r_s = -0.46$ ,  $p = 0.07$  respectivamente) ni tampoco la hubo entre la cantidad de leche que ingirieron los sujetos NAT y ANE y su tiempo de búsqueda sobre la piel con perfume ( $r_s = -0.44$ ,  $p = 0.09$  y  $r_s = -0.29$ ,  $p = 0.27$  respectivamente).

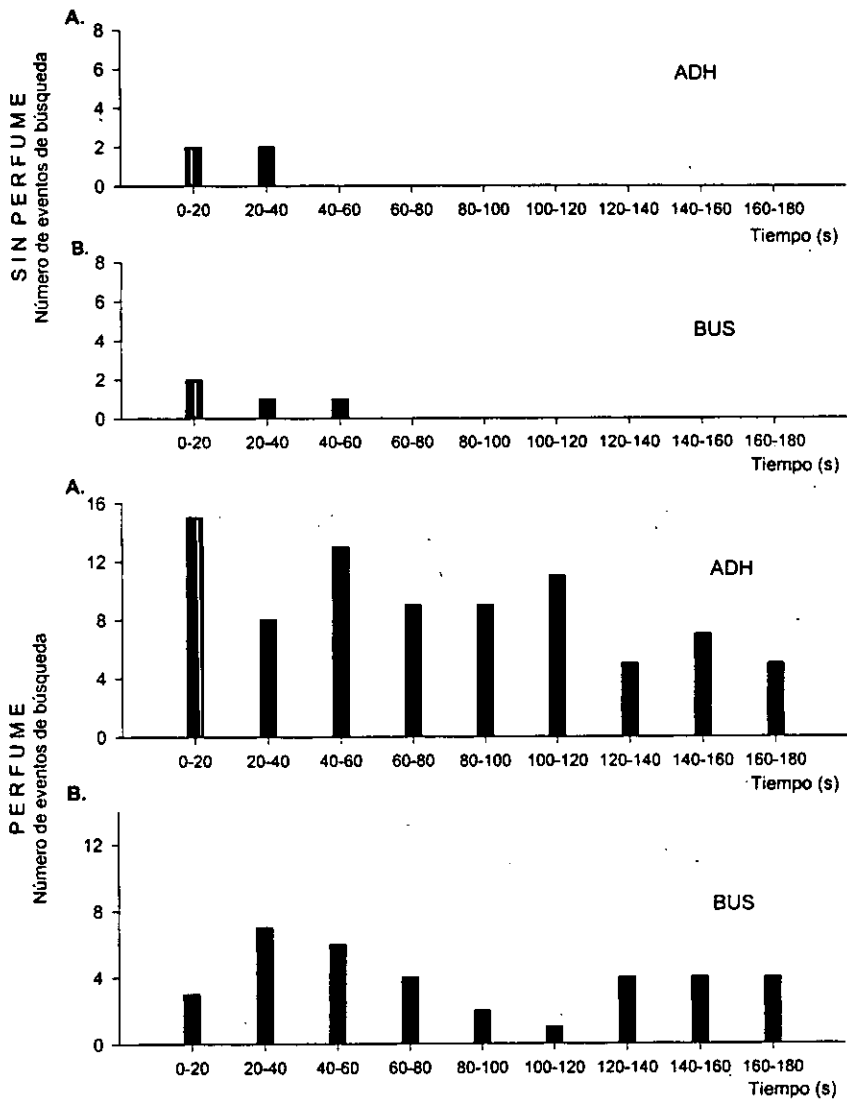


**Fig. 13** Distribución de los eventos de búsqueda durante la prueba de evocación sobre la piel sin perfume; A) NAT y cNAT, B) ANE y cANE y C) SL y cSL. ■ gazapos condicionados □ gazapos no condicionados.



**Fig. 14** Distribución de los eventos de búsqueda durante la prueba de evocación sobre la piel con perfume; A) NAT y cNAT, B) ANE y cANE y C) SL y cSL.

■ gazapos condicionados □ gazapos no condicionados.



**Fig. 15** Distribución de los eventos de búsqueda para los grupos condicionados ADH y BUS durante la prueba de evocación; sobre la piel sin perfume (A y B, arriba) y sobre la piel con perfume (A y B, abajo).

■ gazapos condicionados.



Con el fin de analizar la distribución de la conducta de búsqueda de los gazapos durante la prueba de evocación respecto al área en donde se aplicaban los estímulos (agua o perfume) y así distinguir mejor entre los diferentes grupos, se generó un nuevo análisis que dividió la conducta de los sujetos durante la prueba de evocación en aquella que presentaron dentro del área considerada como de estímulo (ver 5.3.1), y la que presentaron fuera de ella. Este análisis, proveyó un panorama más claro de los datos obtenidos permitiendo diferenciar mejor entre los diferentes grupos condicionados y entre los grupos condicionados y sus propios controles.

#### 6.2.4 Búsqueda dentro y fuera del área de estímulo

*Número de eventos de búsqueda dentro y fuera del área de estímulo.* Los eventos de búsqueda se cuantificaron y se dividieron en aquellos iniciados dentro del área del estímulo y los iniciados fuera de ésta. La Tabla 3 muestra el número total de eventos de búsqueda por grupo y porcentaje de éstos que fueron iniciados dentro del área del estímulo.

Tabla 3. Eventos de búsqueda totales presentados por cada grupo

Condición	Eventos de búsqueda			
	Sin perfume		Con perfume	
	<i>total</i>	<i>% iniciados dentro</i>	<i>total</i>	<i>% iniciados dentro</i>
NAT	15	40	55	87
ANE	18	61	72	76
SL	11	30	83	66
ADH	4	25	82	66
BUS	4	100	35	46
cNAT	12	42	5	60
cANE	10	80	5	80
cSL	18	30	7	14

a) *Piel sin perfume:* un ANOVA (Kruskal-Wallis) mostró que los grupos controles cNAT, cANE y cSL, no difirieron entre sí para estas medidas. Por su parte los grupos condicionados NAT, ANE, ADH y SL, fueron significativamente distintos entre sí, difiriendo en los eventos iniciados dentro y los eventos iniciados fuera del área de aplicación del agua ( $H = 12.2, p = 0.02$  y  $H = 10.4, p = 0.034$  respectivamente). Sin embargo, no hubo diferencia entre los valores presentados por los condicionados respecto a aquellos

presentados por sus controles. De ello deriva que las diferencias entre condicionados sobre esta piel no se consideraron importantes (Fig. 16.).

b) *Piel con perfume*: sobre la piel con perfume el mismo análisis mostró que los sujetos controles tampoco difirieron entre sí. Los condicionados difirieron significativamente entre sí en términos del número de eventos de búsqueda iniciados dentro del área de aplicación del perfume ( $H = 10.6, p = 0.03$ ) pero no en aquellos iniciados fuera de ella. NAT, ANE SL y ADH iniciaron respectivamente el 87.3%, 76.4%, 66.3% y 65.9% de sus búsquedas dentro del área mientras que BUS solo inició un 45.7% ahí (Tabla 3):

También sobre esta piel todos los grupos condicionados difirieron con sus controles, presentando un mayor número de eventos iniciados dentro del área del estímulo que ellos (NAT/cNAT:  $U = 48, p = 0.001$ ; ANE/cANE:  $U = 24, p < 0.0001$ ; SL/cSL:  $U = 46, p = 0.0004$ , ADH/cTODOS:  $U = 77, p < 0.000$ , BUS/cTODOS:  $U = 282, p = 0.02$ , Fig. 16).

En la piel perfumada la diferencia entre los grupos condicionados se dio entre NAT, ANE, SL, y ADH respecto a BUS ya que éstos primeros presentaron un número de eventos iniciados dentro del área significativamente mayor a éste último grupo ( $U = 74, p = 0.031$ ;  $U = 48, p = 0.002$ ;  $U = 78, p = 0.046$ ;  $U = 58, p = 0.006$  respectivamente). No hubo diferencias entre los grupos condicionados para el número de eventos iniciados fuera del área.

*Tiempo de permanencia dentro y fuera*. Todos los grupos, tanto en la piel sin perfume como en la piel perfumada, permanecieron la mayor parte de la prueba de evocación fuera del área del estímulo. En general los gazapos pasaban la mayor parte del tiempo pegados a las paredes de la arena de prueba, desplazándose como guiados por ellas, con el hocico dirigido hacia el acrílico y hacia arriba. Solo cuando el hocico tocaba la piel se iniciaban los eventuales eventos de búsqueda o la rasquiña. De los 180 s que duraba la prueba de evocación, el porcentaje del tiempo que todos los sujetos condicionados permanecieron dentro del área fue de 8.2% y 10.5% para las pieles sin y con perfume respectivamente y para los sujetos controles fue de 6.9% y 6.7%.

La Figura 17 muestra el tiempo total que los gazapos permanecieron dentro o fuera del área del estímulo que era una elipse en el centro de la arena y que abarcaba 1/5 del área total (Fig 9., 5.3.1) tanto en la piel sin perfume como en la perfumada. No hubo diferencias significativas entre los grupos condicionados ni entre los controles en términos del tiempo que pasaron fuera del área en donde se aplicaban el agua o el perfume respectivamente. Para el tiempo que pasaron dentro del área, solo hubo diferencias entre los condicionados sobre la piel sin perfume ( $H = 12.01, p = 0.02$ ). Sin embargo como no hubo diferencias sobre esta piel entre los condicionados y sus controles las variaciones entre condicionados no se creyeron relevantes.

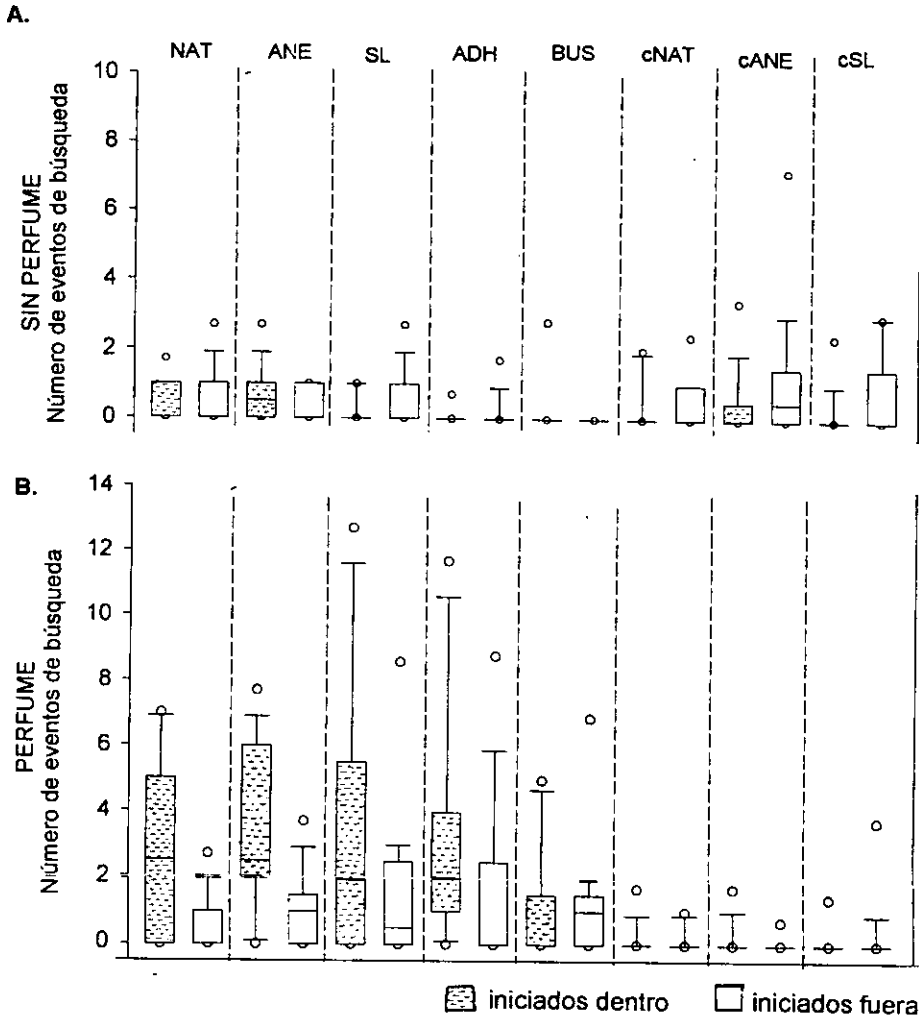
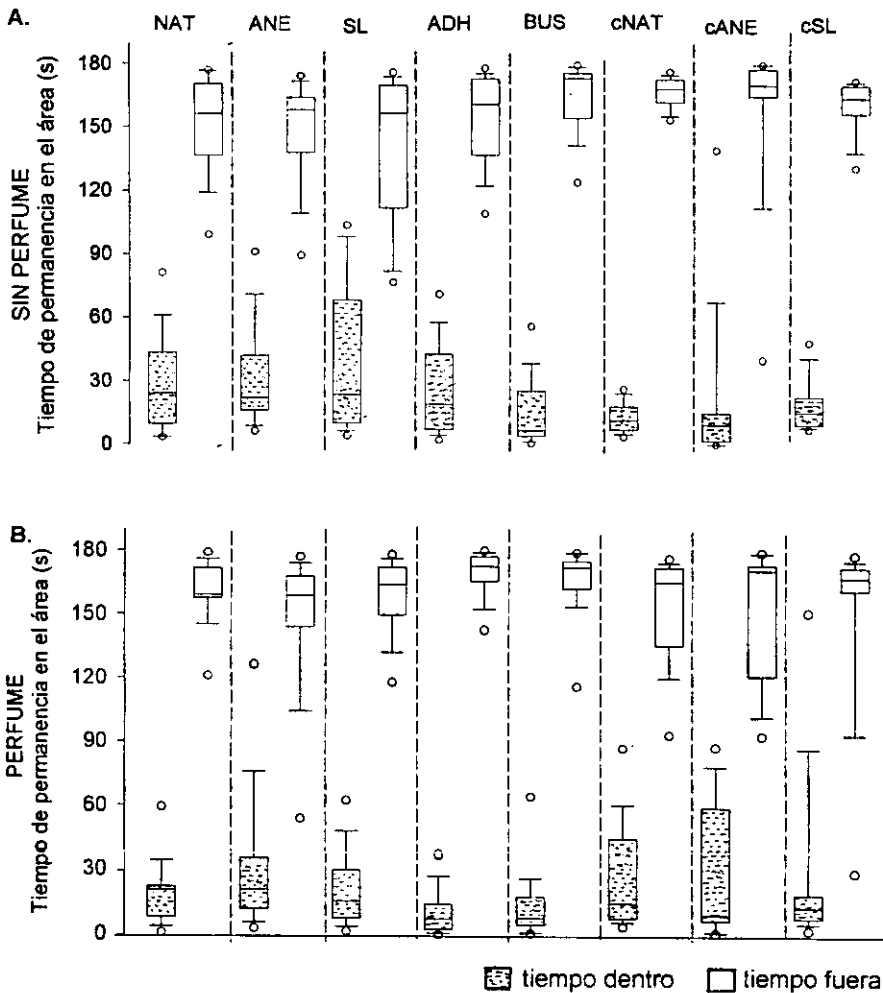


Fig. 16. Eventos de búsqueda promedios iniciados dentro o fuera del área de estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación; diagrama de caja y bigotes: la caja muestra los cuartiles (25 y 75%) y las medianas (línea dividiendo la caja), los bigotes delimitan el rango de los datos y los círculos representan a los sujetos fuera de rango; A) piel sin perfume B) piel con perfume. Las barras oscuras representan las búsquedas iniciadas dentro del área y las barras blancas las búsquedas iniciadas fuera de ésta.



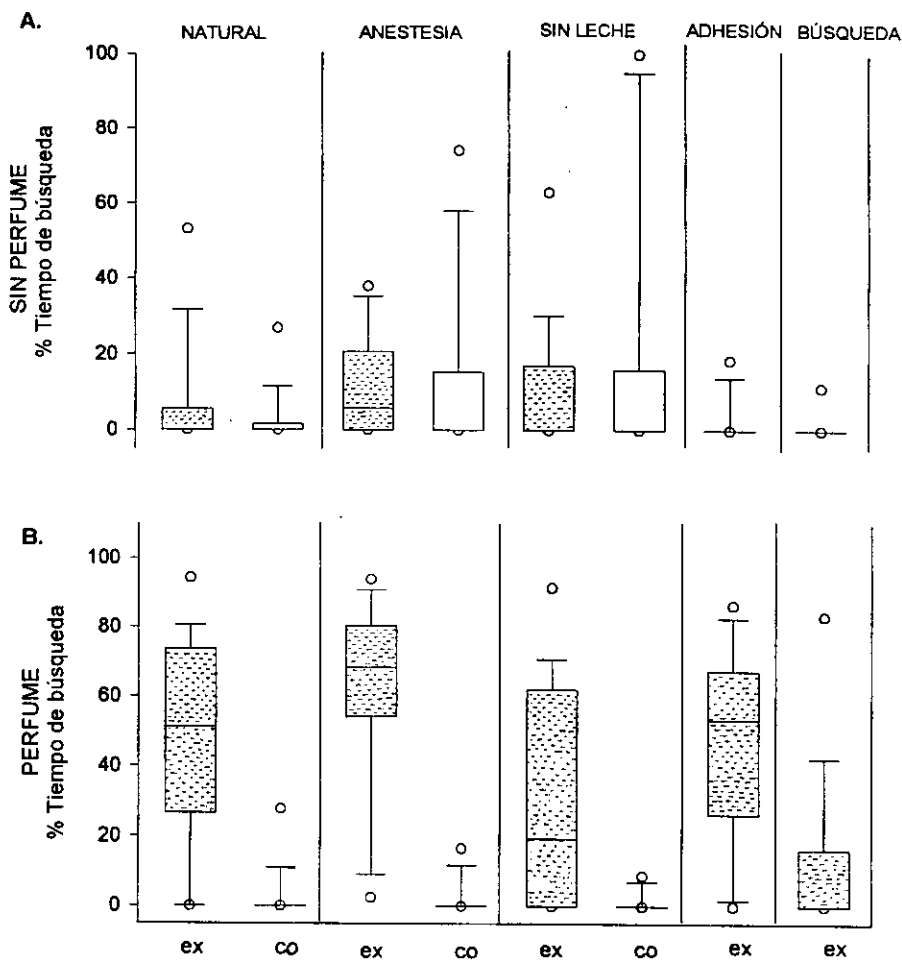
**Fig. 17.** Tiempo total de permanencia dentro o fuera del área del estímulo para todos los grupos; diagrama de caja y bigotes: la caja muestra los cuartiles (25 y 75%) y las medianas (línea dividiendo la caja), los bigotes delimitan el rango de los datos y los círculos representan a los sujetos fuera de rango; A) piel sin perfume B) piel con perfume. Las barras oscuras representan el tiempo total de permanencia dentro del área y las barras blancas el tiempo total fuera de ésta.

*Tiempo relativo buscando.* Una vez diferenciado el tiempo que los gazapos pasaron fuera o dentro del área del estímulo se calculó qué porcentaje del tiempo que los sujetos permanecieron en cada área, fue tiempo que pasaron ejerciendo la conducta de búsqueda (Figs. 18 y 19). Los datos se manejaron como porcentajes con el fin de normalizar el tiempo de búsqueda proporcional al tiempo de permanencia dentro o fuera del área que cada grupo presentó:

a) *Tiempo buscando dentro (%)*: como se puede ver en la Fig. 18, los grupos controles no presentaron ninguna diferencia significativa entre sí en el tiempo de búsqueda dentro del área sobre ninguna de las pieles. Los grupos condicionados fueron distintos entre sí sobre la piel sin perfume ( $H = 11, p = 0.03$ ) pero no difirieron sobre esta piel con sus controles por lo que ésta diferencia no se creyó importante.

La diferencia más significativa entre los grupos condicionados se encontraba en el porcentaje del tiempo dentro del área que los sujetos pasaron buscando sobre la piel perfumada ( $H = 20.6, p = 0.0004$ ). La mediana del tiempo buscando dentro para los grupos condicionados NAT, ANE, SL y ADH fue de 51.3%, 68.4%, 19.4% y 53% respectivamente mientras que para BUS fue de 0%. Esta medida también arrojó las mayores diferencias entre los grupos condicionados y sus controles (NAT/cNAT:  $U = 29, p < 0.0001$ ; ANE/cANE:  $U = 12, p < 0.0001$ ; SL/cSL:  $U = 49, p = 0.0008$ , ADH/cTODOS:  $U = 60, p < 0.0001$ , BUS/cTODOS:  $U = 282, p = 0.024$ ) aunque el grupo BUS fue el que presentó la diferencia menos significativa respecto a los controles. Entre los grupos condicionados sobre la piel con perfume las diferencias significativas se encontraron entre BUS y NAT ( $U = 51, p = 0.003$ ), BUS y ANE ( $U = 33, p = 0.0003$ ), BUS y ADH ( $U = 43, p = 0.001$ ) y ANE y SL ( $U = 59, p = 0.009$ ). Solo SL no fue significativamente diferente a BUS para esta medida.

b) *Tiempo buscando fuera (%)*: como se puede ver en la Fig. 19, sobre la piel sin perfume los controles se comportaron todos de la misma manera pero los condicionados sí difirieron entre sí ( $H = 11, p = 0.03$ ) ya que NAT, ANE y SL buscaron más fuera del área del estímulo que BUS ( $U = 72, p = 0.004, U = 80, p = 0.008$  y  $U = 80, p = 0.008$  respectivamente). Sin embargo no hubo diferencias en el tiempo de búsqueda entre los grupos condicionados (Mediana = 0.0 s) y sus controles ( $M = 0.1$  s) para ésta piel y por lo tanto las diferencias entre condicionados no se creyeron relevantes. Sobre la piel con perfume no hubo diferencias significativas en el tiempo de búsqueda fuera del área ni entre los condicionados ni entre los controles.



**Fig. 18** Porcentaje de búsqueda relativo al tiempo total de permanencia dentro del área del estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación; diagrama de caja y bigotes: la caja muestra los cuartiles (25 y 75%) y las medianas (línea dividiendo la caja), los bigotes delimitan el rango de los datos y los círculos representan a los sujetos fuera de rango: A) piel sin perfume B) piel con perfume. La Figura muestra el porcentaje del tiempo dentro del área del estímulo que los gachos de cada grupo pasaron buscando. Las barras oscuras (ex) corresponden a los grupos condicionados y las barras blancas (co) a los grupos controles no condicionados.

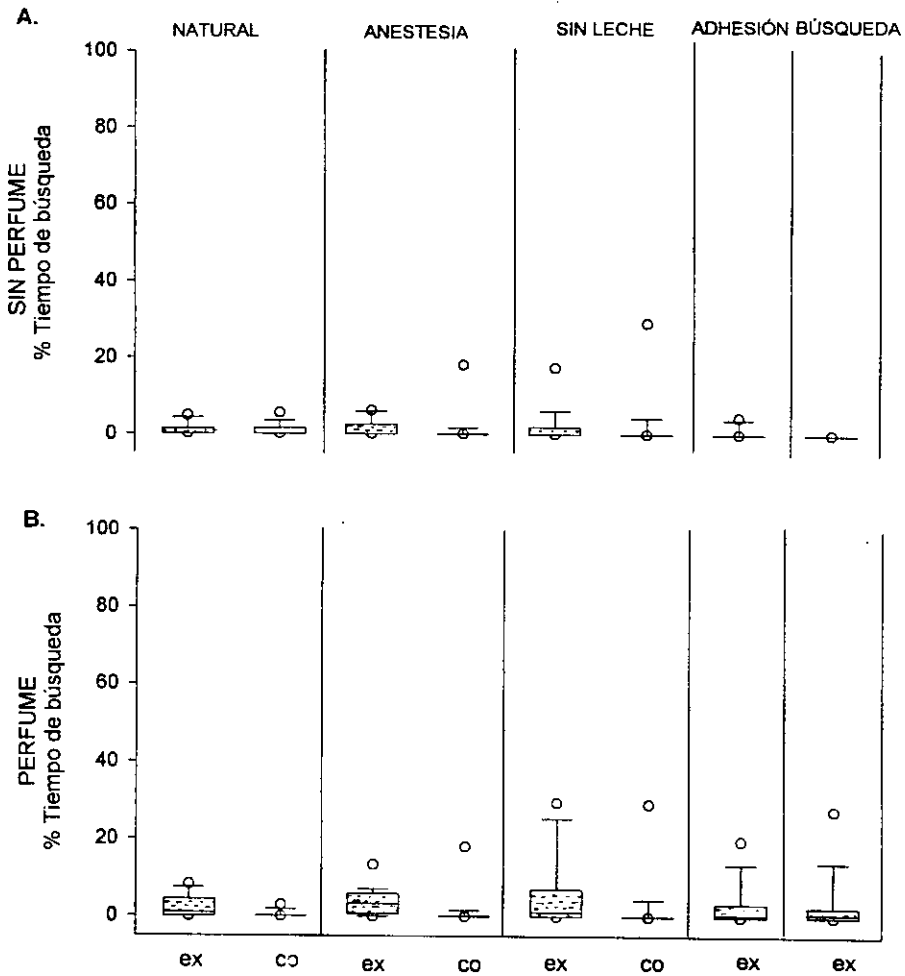


Fig. 19 Porcentaje de búsqueda relativo al tiempo total de permanencia fuera del área del estímulo para cada grupo durante la prueba de evocación; A) piel sin perfume B) piel con perfume. Explicación como para Fig.18. Las barras oscuras (ex) corresponden a los grupos condicionados y las barras blancas (co) a los grupos controles no condicionados.

## 7. Discusión y Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran, en primera instancia, que el modelo de condicionamiento olfativo en los conejos neonatos llevado a cabo por Hudson y sus colaboradores en Alemania y en Francia (Hudson 1985, Kindermann et al 1991, 1994, Allingham et al 1999) es replicable ya que, en las condiciones particulares de nuestro laboratorio, los gazapos aprendieron a reconocer un olor asociado al amamantamiento después de una sola exposición en condiciones seminaturales, esto es, en el nido. Además, la efectividad de ésta técnica para condicionar a los gazapos a olores novedosos se vio corroborada y enriquecida por el hecho de que los gazapos aprenden, de manera igualmente robusta y eficiente, olores aplicados sobre una madre anestesiada y sujeta bocarriba. Esta era una condición esencial para poder profundizar en el estudio de cuáles son los reforzadores relevantes para este tipo de aprendizaje asociativo.

Una vez establecido este condicionamiento controlado, se pudo aplicar el modelo a un primer análisis de las propiedades reforzantes de diferentes estímulos presentes durante el evento de amamantamiento como son la leche, la estimulación táctil recibida por los gazapos al desplazarse ejerciendo la conducta de búsqueda, la estimulación introral que recibieron los gazapos al adherirse a los pezones y la presencia de la feromona materna.

El hallazgo principal de este trabajo fue el hecho de que la adhesión y succión no nutritiva, esto es, la mera estimulación introral, juega un papel principal en este tipo de aprendizaje olfativo neonatal (Figs. 12 y 18). Los gazapos inmovilizados y sin acceso a la leche pero que se podían adherir a y succionar los pezones (ADH), aprendieron más y respondieron con mayor especificidad al olor condicionante que los sujetos condicionados sin leche y con búsqueda libre (SL). Estando la leche ausente en ambos grupos, la diferencia principal entre ellos fue el tiempo de adhesión, significativamente mayor en los gazapos inmovilizados que en los que presentaron búsqueda libre. La importancia de la estimulación introral se vio posteriormente apoyada por el hecho de que los únicos sujetos que no la tuvieron (grupo BUS), presentaron un nivel más bajo en el aprendizaje (según las medidas evaluadas en este trabajo) respecto a los demás grupos, significativamente menor a la de los grupos NAT, ANE y ADH pero no respecto a SL (Fig. 12), con menos sujetos buscando por grupo (Tabla 2) y con búsquedas menos acotadas al área del estímulo (Fig. 18). Aunque se podría pensar que el sujetar a los sujetos como en el caso de ADH podría fungir como una estimulación táctil adicional, el resto de los grupos que presentaron búsqueda libre debieron haber recibido igual o mayor estimulación corporal al desplazarse por el vientre de la madre.



Otros dos resultados de este trabajo fueron que:

1) La leche, a pesar de su importante papel biológico y su función de reforzador en otros paradigmas de aprendizaje (Brake 1981, Johanson y Hall 1982, Sullivan y Hall 1988, Cheslock et al 2000) no parece tener un papel relevante en la consolidación de este aprendizaje en particular. Removerla no impide que los gazapos aprendan el olor como se evidencia por el aprendizaje de los grupos SL, ADH y BUS y en particular, como se explicó anteriormente, ADH es la evidencia más clara de esto ya que este grupo estuvo tan bien condicionado como NAT y ANE quienes sí ingirieron leche (Fig. 12). El resultado se hace más robusto aún ante la ausencia de correlación entre la cantidad de leche ingerida y cantidad de tiempo de búsqueda para estos dos últimos grupos.

2) A pesar de que es una condición necesaria para que los gazapos presenten la conducta de búsqueda, la presencia de la feromona sola, al menos en las concentraciones naturales en las que se presenta, no es suficiente para que el aprendizaje del nuevo olor sea robusto, a pesar del elevado estado motivacional que genera en los gazapos. Esto se hizo evidente por los resultados del grupo BUS. Los sujetos tuvieron contacto directo con la feromona sobre el vientre de la madre, inclusive recibieron estimulación táctil en el cuerpo y en el hocico al buscar pero estos estímulos no fueron suficientes para que los gazapos aprendieran a responder clara y específicamente al olor. La ausencia de la adhesión y succión tuvo como consecuencia que la respuesta de los gazapos al perfume fuera reducida y poco específica, más como una respuesta generalizada de reconocimiento y no como el establecimiento claro de una asociación olor-pezón (Figs. 16 y 18).

El hecho de que la leche, la feromona y la ejecución de la conducta de búsqueda no hayan tenido un papel principal como reforzadores del aprendizaje no implica que no participen de ninguna manera en su consolidación. Es posible que la leche tenga un papel secundario en términos de que su presencia mantiene a los gazapos adheridos a los pezones por más tiempo como en el caso de los sujetos ANE y que, como se mencionó para las ratas neonatas, con el paso del tiempo el papel reforzador de la succión no nutritiva se vea sustituido por la succión nutritiva, esto es, la ingesta de leche (Blass y Teicher 1980). Inclusive se ha observado que los gazapos son capaces de aprender a asociar rápidamente una infusión introral de leche diaria con el olor de la mano del experimentador que la administra (Hudson et al 1990, Hudson comunicación personal). A partir de los resultados obtenidos aquí tampoco podemos descartar el que la feromona por sí misma pudiera fungir como reforzador si fuera presentada a los gazapos en altas concentraciones y/o durante periodos de tiempo más prolongados. También es cierto que este trabajo no descarta directamente el que sujetar a los gazapos, como en el caso de ADH, tenga un efecto reforzante como lo tiene la estimulación táctil en otros paradigmas de aprendizaje olfativo (Sullivan y Hall 1988).

Sin embargo, lo que este trabajo revela es que, en condiciones seminaturales, con las concentraciones normales de feromona y el tiempo normal de amamantamiento la presencia de la estimulación introral ensombrece el efecto reforzante de otros estímulos.

Los resultados aquí presentados encuentran sustento en otros estudios en donde se ha demostrado que las ratas neonatas succionan pezones con o sin leche en igual proporción y por la misma cantidad de tiempo (Blass y Teicher 1980), que son capaces de aprender pruebas de ejecución espacial (Kenny y Blass 1977) y pruebas de preferencia (Brake 1981) usando la succión no nutritiva como reforzador, además de que pueden sostener una conducta de aproximación a la madre usando un pezón sin leche como recompensa (Amsel et al 1976). Gorsaud y Nowak (1999) reportan que también los corderos ejecutan pruebas de preferencia a la madre si se les refuerza con succión no nutritiva, aunque con menos efectividad que si se les refuerza con succión y leche. En bebés humanos, es reconocido el efecto apaciguador de la succión de chupones y se ha reportado que la succión no nutritiva promueve crecimiento, salud y bienestar a los pequeños que resulta en que éstos sujetos prematuros pueden salir antes de los hospitales (Field et al 1982, Bernbaum et al 1983, Gunnar et al 1984, Miller y Anderson 1993, Pickler et al 1996). Otros estudios en animales apoyan el hecho de que la succión es importante como recompensa durante la etapa temprana postparto hasta el momento en que es relevada por la succión nutritiva como reforzador prominente (Blass y Teicher 1980, Hall 1990, Myers y Hall 1998).

Posiblemente la principal diferencia entre los estudios aquí mencionados y éste trabajo es que los gazapos adquieren el aprendizaje en un solo evento de tan solo 3 min mientras que ratas y corderos requieren de varios momentos de apareamiento entre estímulos condicionado y no condicionado o periodos de exposición largos. En este contexto, los gazapos se enfrentan a presiones particularmente severas durante el amamantamiento. Es posible que, para los gazapos, este sea uno de los factores que le confiere más importancia a la succión en sí que a la ingestión de leche. Ya que es común que los gazapos no logren ingerir leche en grandes cantidades, sobre todo durante los primeros amamantamientos (observación personal, Hudson comunicación personal, Drummond et al 2000) tendrían que ser capaces de responder a otros estímulos presentes como olores o el hecho de simplemente adherirse ya que, asociar la leche con la madre y no recibir suficiente leche podría debilitar indirectamente la respuesta de los gazapos al ensombrecer la asociación madre-conducta de búsqueda.

Una similitud con los estudios citados es que el efecto reforzador de la succión no nutritiva no implica que la leche no tenga una función reforzadora sino que más bien depende del paradigma experimental en el que se emplee y del tipo de aprendizaje que se pretende que los animales establezcan. Esto sería cierto también para otros estímulos como la estimulación táctil o la feromona en dado caso. El valor del modelo del conejo neonato radica en que simula directamente un evento natural, una

circunstancia de vida a la que los gazapos se enfrentan en la naturaleza. Dentro de éste contexto es que la succión tiene un papel principal.

A lo largo de la elaboración de este trabajo se hicieron evidentes varios errores y algunas limitaciones propias del modelo que vale la pena mencionar con el ánimo de que se eviten en posteriores estudios. Uno de los errores fue el no controlar más rigurosamente la sincronización de los horarios del condicionamiento y la prueba de evocación, sobre todo a la luz de la importancia de la notoria sincronía circádica entre las hembras y sus crías (Hudson y Distel 1989, Escobar et al 2000, Gilge y Hudson 2001). A la par, es importante también controlar continuamente la temperatura de la arena de prueba y la temperatura ambiental ya que estas pudieron haber afectado el estado general de los gazapos quienes son muy sensibles a cambios térmicos (Hull y Hull 1982). Durante el condicionamiento, es importante evitar variaciones debidas a la manipulación como fue el caso de sujetos a los que se les dejó adherirse por más de los 10 s establecidos o por menos.

En términos del modelo experimental, los tiempos de exposición a la madre durante el condicionamiento variaron mucho entre los grupos. Este hecho es intrínseco al diseño ya que el tiempo sobre la madre depende de los gazapos, de su habilidad para desplazarse, buscar y adherirse. En particular para BUS sí hubo un error de diseño ya que, con base en los tiempos promedio de succión reportados por Hudson y Distel (1982), se les colocó sobre la madre un total de 100 s, tiempo que resultó ser casi la mitad o una tercera parte menos de tiempo que los otros grupos estuvieron en contacto con la madre ya que no se tomó en cuenta que el tiempo de succión es menor al tiempo real de contacto. Sin embargo, a pesar de estos errores, el modelo experimental funcionó y los objetivos se cumplieron ampliamente.

Metodológicamente este estudio provee de dos resultados útiles si se pretende ahondar en el aprendizaje neonatal de los gazapos. El primero es que se hizo evidente, por la gran cantidad de datos y resultados similares, que establecer grupos controles y grupos condicionados y además probar a los gazapos sobre una piel sin perfume y sobre una piel con perfume, es generar controles innecesarios o redundantes. Se sugiere por tanto eliminar la prueba sobre la piel sin perfume, tomando en cuenta también que dos pruebas desgastan mucho más a los gazapos que una sola. El segundo resultado fue que el dividir el área de prueba en dentro y fuera del área del estímulo permitió esclarecer mejor las diferencias entre los grupos y fungió adecuadamente como una medida de la robustez del aprendizaje pues hacia evidente qué tan específico era éste. Por su parte dividir la conducta total en las categorías de búsqueda, rasquiña, desplazamiento e inmovilidad no brindó resultados que permitieran diferenciar entre los grupos claramente y por tanto se cree que es una medida innecesaria o poco útil para posteriores estudios.

Este trabajo no pretende ser un análisis exhaustivo sobre los distintos estímulos y sus propiedades reforzantes sino más bien pretende establecer una primera aproximación al estudio del aprendizaje olfativo neonatal en los conejos como un modelo mamífero.

Restan aún muchas preguntas a cerca de las características de y los mecanismos a través de los cuales diferentes estímulos promueven el aprendizaje durante el amamantamiento en los gazapos. Como posibles futuros experimentos debiera analizarse si la leche, en ausencia de succión, cobra mayor relevancia como reforzador durante el aprendizaje olfativo o si es necesaria para sostener el aprendizaje por periodos de retención más extensos que 24 h. También sería importante evaluar si presentarle a los gazapos la feromona a diferentes concentraciones o por periodos más prolongados también tendría como consecuencia el aprendizaje, aún en ausencia del resto de los estímulos como leche y succión. Para descartar por completo el que sujetar a los gazapos fungiera como una estimulación táctil reforzante, se tendrá que elaborar un experimento en el cual los gazapos sean sujetos al igual que para el grupo ADH pero en donde se retire la succión.

Dentro de otras características de este aprendizaje, queda abierto el campo de los correlatos neurales que lo subyacen. Este estudio provee de los medios para poder manipular el eventos de aprendizaje en distintos momentos, como serían adquisición, consolidación y evocación ya el experimentador tiene acceso libre a los gazapos durante todo el periodo que acompaña al aprendizaje y el condicionamiento controlado permite eventuales intervenciones farmacológicas con facilidad.

Los resultados en términos de la relevancia de la estimulación introral dirigen al atención al papel de la succión no nutritiva como reforzador para los mamíferos neonatos y también marcan una dirección en la investigación de los procesos neurales, señalando la importancia de las señales provistas por el trigémino durante la succión para la consolidación del aprendizaje.

## 8: Bibliografía

- Agosta WC (1992) *Chemical Communication*. Scientific American Library, Nueva York.
- Alberts JR (1976) Olfactory contributions to behavioral development in rodents. En RL Doty (Ed) *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior*. Academic Press, Nueva York. pp 67-94
- Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H, Hudson R (1998) Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res* 783: 210-218
- Allingham K, Brennan PA, Distel H, Hudson R (1999) Expression of c-Fos in the main olfactory bulb of neonatal rabbits in response to garlic as a novel and conditioned odour. *Behav Brain Res* 104: 157-167
- Amsel A, Burdette DR, Letz R (1976) Appetitive learning, patterned alternation, and extinction in 10-d-old rats with non-lactating suckling as reward. *Nature* 262: 816-818
- Appel KR, Busse H, Schulz KD, Wilk W (1971) Beitrag zur Handaufzucht von gnotobiotischen und SPF-Kaninchen [Manual rearing of gnotobiotic and SPF rabbits]. *Z Versuchstierkunde* 13: 282-290
- Beauchamp GK, Doty DG, Moulton DG, Mugford RA (1976) The pheromone concept in mammalian chemical communication: a critique. En RL Doty (Ed) *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes and Behavior*, Academic Press, Nueva York. pp 143-160
- Bernbaum J, Pereira G, Watlins J, Packman G (1983) Nonnutritive sucking during gavage feeding enhances growth and maturation in premature infants. *Pediatrics* 71: 41-45
- Bilkó Á, Altbácker V, Hudson R (1994) Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiol Behav* 56: 907-912
- Blass EM, Teicher MH (1980) Suckling. *Science* 210: 15-22
- Brake SC (1981) Suckling infant rats learn a preference for a novel olfactory stimulus paired with milk delivery. *Science* 211: 506-508
- Brennan PA, Keverne EB (1997) Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* 51: 457-481
- Brockhuizen S, Mulder S (1983) Differences and similarities in nursing behaviour of hares and rabbits. *Acta Zool Fennica* 5: 53-54
- Camp LL, Rudy JW (1988) Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Dev Psychobiol* 21: 25-42
- Cheslock SJ, Varlinskaya EI, Petrov ES, Spear NE (2000) Rapid and robust olfactory conditioning with milk before suckling experience: promotion of nipple attachment in newborn rat. *Behav Neurosci* 114: 484-495
- Coureaud G, Schaal B, Coudert P, Hudson R, Rideaud P, Ogeur P (2000) Mimicking natural nursing

- conditions promotes early pup survival in domestic rabbits. *Ethology* 106: 207-225
- Coyle S, Arnold HM, Goldberg-Arnold JS, Rubin DC, Hall WG (2000) Olfactory conditioning facilitates diet transition in human infants. *Dev Psychobiol* 37: 144-152
- Deutsch JA (1957) Nest building behaviour of domestic rabbits under seminatural conditions. *Brit J Anim Behav* 5: 53-54
- Devor M, Schneider GE (1974) Attraction to home-cage odor in hamster pups: specificity and changes with age. *Behav Biol* 10: 211-221
- Distel H, Hudson R (1984) Nipple-search performance by rabbit pups: changes with age and time of day. *Anim Behav* 32: 501-507
- Distel H, Hudson R (1985) The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *J Comp Physiol A* 157: 599-605
- Distel H, Ayabe-Kanamura S, Martínez-Gómez M, Schicker I, Kobayakawa T, Saito S, Hudson R (1999) Perception of everyday odors--correlation between intensity, familiarity and strength of hedonic judgement. *Chem Senses* 24: 191-199
- Doty R (1995) Introduction and historical perspective. En RL Doty (Ed) *Handbook of Olfaction and Gustation*. Marcel Dekker, Nueva York. pp 1-32
- Drewett RF, Kendrick KM, Sanders DJ, Trew AM (1982) A quantitative analysis of the feeding behavior of suckling rabbits. *Dev Psychobiol* 15: 25-32
- Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martínez-Gómez M, Hudson R (2000) Competition for milk in the domestic rabbit: survivors benefit from littermate deaths. *Ethology* 106: 511-526
- Escobar C, Hudson R, Martínez-Gómez M, Aguilar-Roblero R (2000) Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J Comp Physiol A* 186: 33-38
- Field T, Ignatoff E, Stringer S, Brennan J, Greenberg R, Widmayer S, Anderson G (1982) Nonnutritive sucking during tube feeding: effects on preterm neonates in an intensive care unit. *Pediatrics* 70: 381-384
- Finger TE, Silver WL (1987) *The Neurobiology of Taste and Smell*. John Wiley, Nueva York.
- Futuyma DJ (1998) *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass
- González-Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C, Rosenblatt JS (1994) Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav* 55: 1081-1089
- González-Mariscal G, Melo AI, Jiménez P, Beyer C, Rosenblatt JS (1996) Estradiol, progesterone, and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits. *J Neuroendocrinol* 8: 901-907
- Goursaud AP, Nowak R (1999) Colostrum mediates the development of mother preference by newborn lambs. *Physiol Behav* 67: 49-56

- Gunnar M, Fisch RO, Malone S (1984) The effects of a pacifying stimulus on behavioral and adrenocortical responses to circumcision in the newborn. *J Amer Acad Child Psychiatry* 23: 34-38
- Hall WG (1990) The ontogeny of ingestive behavior: changing control of components in the feeding sequence. En EM Stricker (Ed) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (Vol: 10) Plenum Press, Nueva York. pp 77-123
- Haller R, Rummel C, Henneberg S, Pollmer U, Köster EP (1999) The influence of early experience with vainillin on food preference later in life. *Chem Senses* 24: 465-467
- Hickman CP, Roberts LS, Larson A (1997) *Zoology*. (10a ed.). W C Brown Publishers, Dubuque IA.
- Hofer MA, Fisher A, Shair H (1981) Effects of infraorbital nerve section on survival, growth, and suckling behaviors of developing rats. *J Comp Physiol Psychol* 95: 123-133
- Hudson R (1985) Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior? *Dev Psychobiol* 18: 575-85
- Hudson R (1993a) Rapid odor learning in newborn rabbits: connecting sensory input to motor output. *German J Psychol* 17: 267-275
- Hudson R (1993b) Olfactory imprinting. *Current Opinion Neurobiol* 3: 548-552
- Hudson R (1999) From molecule to mind: the role of experience in shaping olfactory function. *J Comp Physiol A* 185: 297-304
- Hudson R, Distel H (1982) The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. 79: 255-271
- Hudson R, Distel H (1983) Nipple location by newborn rabbits: behavioural evidence for pheromonal guidance. *Behav* 85: 260-275
- Hudson R, Distel H (1984) Nipple-search pheromone in rabbits: dependence on season and reproductive state. *J Comp Physiol A* 155: 13-17
- Hudson R, Distel H (1986) Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 37: 123-128
- Hudson R, Distel H (1987) Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Res* 421: 85-94
- Hudson R, Distel H (1989) The temporal pattern of suckling in rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. En SM Reppert (Ed) *Development of Circadian Rhythmicity and Photoperiodism in Mammals*. Perinatology Press, Boston. pp 83-102
- Hudson R, Distel H (1990) Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 167: 225-230
- Hudson R, Distel H, Zippel HP (1990) Perceptual performance in peripherally reduced olfactory systems. En D Schild (Ed) *Chemosensory Information Processing*. Springer-Verlag, Berlin. pp 259-269
- Hudson R, Altbäcker V (1994) Development of feeding and food preference in the European rabbit:

- environmental and maturational determinants. En BG Galef, M Mainardi, P Valsecchi (Eds.) *Behavioral Aspects of Feeding: Basic and Applied Research in Mammals*. Harwood Academic Publishers, Chur. pp 125-145
- Hudson R, Distel H (1995) On the nature and action of the rabbit nipple-search pheromone: a review. En R Apfelbach, D Müller-Shwarze, K Reuter, E Weiler (Eds) *Chemical Signals in Vertebrates VII* Elsevier Science, Oxford. pp 223-232
- Hudson R, Müller A, Kennedy GA (1995) Parturition in the rabbit is compromised by daytime nursing: the role of oxytocin. *Biol Reprod* 53: 519-524
- Hudson R, Bilkó Á, Altbäcker V (1996) Nursing, weaning and the development of independent feeding in the rabbit. *Z Säugetierkunde* 61: 39-48
- Hudson R, Schaal B, Bilkó Á, Altbäcker V (1997) "Juste 3 minutes par jour" ou des soins maternels tres restreints. *Cuniculture* 138: 253-260
- Hudson R, Bachevalier J, Doupe AJ, Fanselow MS, Kuhl PK, Menzel R, Morris RGM, Rudy JW, Squire LR (1998a) Group report: what does behavior tell us about the relationship between development and learning. En T Carew, R. Menzel, C Shatz (Eds) *Mechanistic Relationships Between Development and Learning*. Dahlem Workshop Report, John Wiley, Chichester. pp 75-92
- Hudson R, Cruz Y, Carrillo P, Martínez-Gómez M (1998b) Conducta maternal en el conejo europeo: un recordatorio de la diversidad de los mamíferos. En J. V. Moctezuma (Ed.), *Biología de la Reproducción UAM-I*, México D.F. pp 419-440
- Hudson R, Cruz Y, Lucio A, Ninomiya J, Martínez-Gómez M (1999) Temporal and behavioral patterning of parturition in rabbits and rats. *Physiol Behav* 66: 599-604
- Hull J, Hull D (1982) Behavioral thermoregulation in newborn rabbits. *J Comp Physiol Psychol* 98: 143-147
- Ivanitskii AM (1958) The morphological investigation of development of conditioned alimentary reaction in rabbits during ontogenesis. *Works of the Institute of Higher Nervous Activity* 4:126-141 (en ruso) traducción al inglés (1962) Israel Program for Scientific Translations Ltd.
- Jilge B (1991) The rabbit: a diurnal or a nocturnal animal? *J Exp Anim Sci* 34: 170-183
- Jilge B (1993) The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J Biol Rhythms* 8: 247-260
- Jilge B, Hudson R (2001) Diversity and development of circadian rhythms in the European rabbit. *Chronobiol Internat* 18: 1-26
- Johanson IB, Hall WG (1979) Appetitive learning in 1-day-old rat pups. *Science* 205: 419-421
- Johanson IB, Hall WG (1982) Appetitive conditioning in neonatal rats: conditioned orientation to a novel odor. *Dev Psychobiol* 15: 379-397
- Johanson IB, Hall WG, Polefrone JM (1984) Appetitive conditioning in neonatal rats: conditioned ingestive responding to stimuli paired with oral infusions of milk. *Dev Psychobiol* 17: 357-381



- Kaplan JN, Cubicciotti DD III (1980) Early perceptual experience and social preferences in squirrel monkey. En RW Smotherman (Ed) *Maternal Influences and Early Behavior* Spectrum Publication, Nueva York. pp 253-270
- Kenny JT, Blass EM (1977) Suckling as incentive to instrumental learning in preweanling rats. *Science* 196: 898-899
- Kindermann U, Gervais R, Hudson R (1991) Rapid odor conditioning in newborn rabbits: amnesic effect of hypothermia. *Physiol Behav* 50: 457-460
- Kindermann U, Hudson R, Distel H (1994) Learning of suckling odors by newborn rabbits declines with age and suckling experience. *Dev Psychobiol* 27: 111-122
- Kupfermann I (1991a) Learning and memory. En ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Eds) *Principles of Neural Science* Appelton Lange, Nueva York. pp 997-1008
- Kupfermann I (1991b) Hypothalamus and limbic system: peptidergic neurons, homeostasis and emotional behavior. En ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (Eds) *Principles of Neural Science* Appelton Lange, Nueva York. pp 735-749
- Larson MA, Stein BE (1984) The use of tactile and olfactory cues in neonatal orientation and localization of the nipple. *Dev Psychobiol* 17: 423-436
- Leon M (1992) The neurobiology of filial learning. *Annu Rev Psychol* 43: 377-398
- Lincoln DW (1974) Suckling: a time-constant in the nursing behaviour of the rabbit. *Physiol Behav* 13: 711-714
- Maclean PD (1969). *The Triune Brain*. Plenum Press, Nueva York.
- Martínez-Gómez M, Cruz Y, Lucio RA, Hudson R (en prensa) Conducta maternal. En C Escobar R Aguilar-Roblero (Eds) *Motivación y Conducta: Sus Bases Biológicas*
- Mc Clintock MK (1971) Menstrual synchrony and suppression. *Nature* 291: 244-245
- Mc Clintock MK (1983) Pheromonal enhancement of the ovarian cycle: enhancement, suppression and synchrony. En JG Vandenbergh (Ed) *Pheromones and Reproduction in Mammals* Academic Press, Nueva York. pp 113-149
- McLean JH, Darby-King A, Sullivan RM, King SR (1993) Serotonergic influence on olfactory learning in the neonate rat. *Behav Neural Biol* 60: 152-162
- Miller HD, Anderson GC (1993) Nonnutritive sucking: effects on crying and heart rate in intubated infants requiring mechanical ventilation. *Nursing Res* 42: 305-307
- Müller K (1978) Zum Saugverhalten von Kaninchen unter besonderer Berücksichtigung des Geruchsvermögens. Unpublished Dissertation, Giessen, Alemania.
- Müller-Schwarze D, Müller-Schwarze C (1971) Olfactory imprinting in a precocial mammal. *Nature* 229: 55-56

- Myers KP, Hall WG (1998) Evidence that oral and nutrient reinforcers differentially condition appetitive and consummatory responses to flavors. *Physiol Behav* 64: 493-500
- Pedersen PE, Williams CL, Blass EM (1982) Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 8: 329-341
- Pickler RH, Frankel HB, Walsh KM, Thompson NM (1996) Effects of nonnutritive sucking on behavioral organization and feeding performance in preterm infants. *Nursing Res* 45: 132-135
- Rescorla RA, Holland PC (1982) Behavioral studies of associative learning in animals. *Ann Rev Psychol* 33: 265-308
- Ross S, Sawin PB, Zarrow MX, Denenberg VH (1963) Maternal behavior in the rabbit. En H Rheingold (Ed) *Maternal Behavior in Mammals* John Wiley, Nueva York. pp 94 -121
- Schaal B (1988) Olfaction in infants and children: developmental and functional perspectives. *Chem Senses* 13: 145-190
- Schley P (1976) Untersuchungen zur künstlichen Aufzucht von Hauskaninchen. Unpublished Habilitationsschrift, Giessen.
- Schley P (1977) Die Ausschaltung des Geruchsvermögens und sein Einfluß auf das Saugverhalten von Jungkaninchen [The elimination of the sense of smell and its effect on the suckling behavior in young rabbits]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 90: 382-385
- Schley P (1981) Geruchssinn und Saugverhalten bei Jungkaninchen [Olfaction and suckling behavior in young rabbits]. *Kleintier Praxis* 26: 261-263
- Squire LR (1986) Mechanisms of memory. *Science* 232: 1612-1619
- Stern K, Mc Clintock MK (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* 392: 177-179
- Sullivan RM, Leon M (1986) Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Brain Res* 392: 278-282
- Sullivan RM, Hall WG (1988) Reinforcers in infancy: classical conditioning using stroking or intra-oral infusions of milk as UCS. *Dev Psychobiol* 21: 215-223
- Summerlee AJS, Paisley AC, O'Byrne T, Fairhall KM, Robinson IC, Fletcher J (1986) Aspects of the neuronal and endocrine components of reflex milk ejection in conscious rabbits. *J Endocrinol* 108: 143-149
- Van der Loos H, Woolsey TA (1973) Somatosensory cortex: structural alterations following early injury to sense organs. *Science* 179: 395-398
- Vandenbergh JG (1969) Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinol* 84: 658-660
- Wakerley JB, Clarke G, Summerlee AJS (1994) Milk ejection and its control. En E Knobil JD Neill (Eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Nueva York. pp 1131-1177
- Wilson DA, Sullivan RM (1994) Neurobiology of associative learning in the neonate: early olfactory

learning. *Behav Neural Biol* 61: 1-18

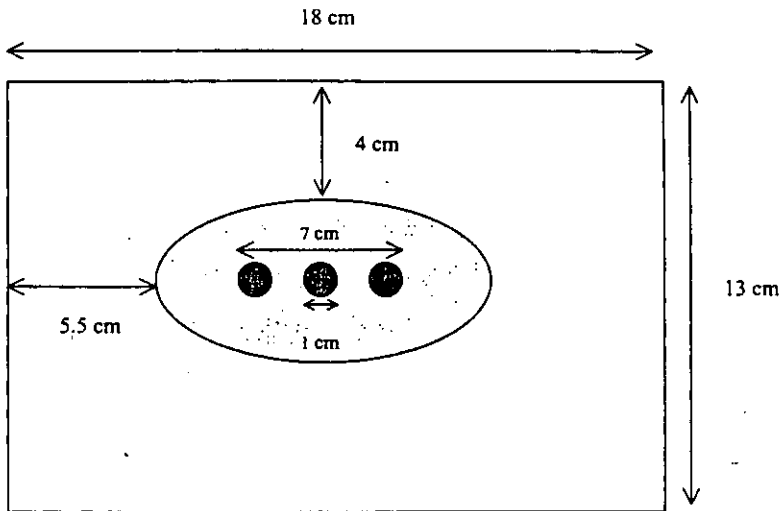
Woolsey TA (1967) Somatosensory, auditory and visual cortical areas of the mouse. *Johns Hopkins Med J* 121: 91-112

Woolsey TA, Wann JR (1976) Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 170: 53-66

Zarrow MX, Denenberg VH, Anderson CO (1965) Rabbit: frequency of suckling in the pup. *Science* 150: 1835-1836

**Anexo**

1. Medidas de la arena de la prueba de evocación



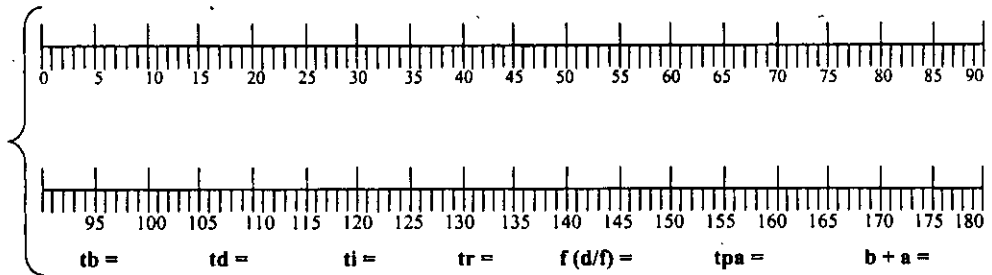
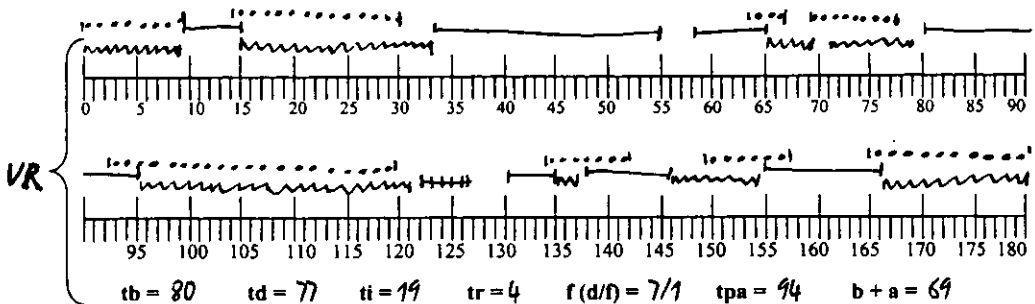
2. Tarjeta identificadora

FECHA:	16/06/01
EXPERIMENTO:	ADHESIÓN
CONDICIÓN:	PERFUME
SUJETO:	AV
CONEJA: 60	

### 3. Hoja de registro

#### Hoja de Registro

Fecha: 16/06/01	Condición: PERFUME
Número de camada: 45	Experimento: ADHESIÓN
Número de video: 36	Experimentador: Daniela



- tb = tiempo de búsqueda (VVV)
- td = tiempo de desplazamiento (—)
- ti = tiempo de inmovilidad ( )
- tr = tiempo de rasquiña (++++)
- f(d/f) = frecuencia de búsquedas dentro/ fuera del área de estímulo
- tpa = tiempo de permanencia en el área de estímulo (●●●●)
- b + a = búsqueda dentro del área del estímulo

Que todo el mérito que haya acumulado mediante este trabajo sirva y sea de beneficio a todos los seres. Que todos los seres obtengan la felicidad y sus causas. Que todos los seres se liberen del sufrimiento y de sus causas. Que una mente verdaderamente altruista surja donde no haya nacido y se incremente donde ya existe. Que todos los seres moremos pronto en la naturaleza clara de nuestra propia mente en beneficio de nosotros y de todos los que nos rodean.

A long as space abides and as long as the world abides, so long may I abide, destroying the sufferings of the world.

*Santideva*